

Implementación de una metodología toxicológica para la rápida determinación del CL50 del sulfato de cobre en peces Cebra (*Danio rerio*) a 24, 48, 72, 96 y 120 horas de exposición

Implementation of a toxicological methodology for the rapid determination of copper sulfate CL50 in zebrafish (*Danio rerio*) 24, 48, 72, 96 and 120 hours of exposure

Recibido: octubre 15 de 2016 | Revisado: noviembre 17 de 2016 | Aceptado: diciembre 15 de 2016

CARLOS SCOTTO ESPINOZA^{1,2,3}
MERCEDES ARRILUCEA TORRES²
GIAN CARLOS VARGAS RAMÍREZ^{2,4}
JOCELYN SALAS CHIPANA^{2,5}
JEFERSON YBAÑEZ CEFERINO^{2,6}

ABSTRACT

Bioassays have been the traditional method for documenting the presence of various contaminants in water. A system was implemented to determine the Lethal Concentration (LC50) of copper sulfate in the Zebrafish (*Danio rerio*) fish. For this test, different exposure times (24, 48, 72, 96 and 120 hours) were planned and executed. It was determined that the LC50 was 0.1875 mg/L at 96 hours of exposure.

Key words: bioassays, zebrafish, CL50, copper sulphate

RESUMEN

Los bioensayos han sido el método tradicional para documentar la presencia de diversos contaminantes en el agua. Se implementó un sistema para determinar la Concentración Letal Media (CL50) del sulfato de cobre en los peces Cebra (*Danio rerio*). Para ello se realizaron ensayos a diferentes tiempos de exposición (24, 48, 72, 96 y 120 horas). Se determinó que la CL50 fue de 0.1875 mg/L a las 96 horas de exposición.

Palabras clave: bioensayos, pez Cebra, CL50, sulfato de cobre

- 1 Laboratorio de Mejora Genética y Reproducción Animal. Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas. Universidad Nacional Federico Villarreal.
- 2 Facultad de Ingeniería Ambiental. Universidad Privada del Norte.
- 3 Correo: carlosscottoespinoza@gmail.com
- 4 Correo: giancarlosvargasramirez@outlook.com
- 5 Correo: jocelyn.salas@hotmail.com
- 6 Correo: jeferson.7.1997@gmail.com

DOI: <http://dx.doi.org/10.24039/cv20164272>

Introducción

En la actualidad, el sulfato de cobre (CuSO_4) tiene muchas aplicaciones en sectores muy diversos del quehacer humano. En la ganadería, es un aditivo en la alimentación que mejora el crecimiento de los animales. Entre sus numerosos usos industriales, cabe destacar sus aplicaciones como conservante o aditivo de pegamentos, entre otros. En la agricultura, es la base de la fabricación de fungicidas agrícolas. Mientas que la acuicultura lo utiliza como alguicida, molusquicida y corrector del déficit de cobre en suelos (Mendoza, 2009; IQV, 2013).

Sin embargo, el sulfato de cobre puede ser altamente tóxico para los animales y especialmente los peces, ya que al ser aplicado en dosis subletales, los iones de cobre interrumpen la osmorregulación de las branquias y causan daños mecánicos y fisiológicos en los organismos (Boyd & Massaut, 1999). Por esta razón, se han desarrollado ensayos de toxicidad que se emplean para diferentes fines y proporcionan resultados útiles para la protección de la salud pública y de la vida acuática frente al impacto causado por la introducción de contaminantes en las aguas, como los relaves mineros, los cuales, debido a un mal tratamiento frecuentemente alcanzan las zonas hídricas (ríos, lagos y/o lagunas) aledañas a las operaciones mineras (OMS, 1997; Millones, 2012).

Debido a que no es viable económicamente determinar la toxicidad específica de cada una de las sustancias tóxicas que pueden aparecer en el agua, se efectúa el ensayo de toxicidad del efluente global mediante la utilización de organismos acuáticos y la observación de respuestas (Montoya, 1981, Metcalf, 1995; Velasco, 2006).

Los peces Cebra (*Danio rerio*) son especies de agua dulce con características muy favorables para la investigación porque crecen en poco tiempo, son de fácil manipulación y cuidado (Lozada Gurán et al., 2002).

En esta investigación se utilizaron los peces cebra para determinar la CL_{50} del sulfato

de cobre y el tiempo de tolerancia fisiológica de dicha especie acuática al sulfato de cobre.

Método

Materiales

- Trescientos peces Cebra
- 50 l. de agua tratada (San Luis)
- Medio ciento de envases de 1 L.
- Guantes de látex
- Guardapolvo
- Red para peces de acuario
- 50 gramos de sulfato de cobre

Preparación de peces Cebra

Los peces fueron aclimatados en el Laboratorio de Mejora Genética y Reproducción Animal de la Facultad de Ciencias Naturales y Matemática de la Universidad Nacional Federico Villarreal, donde fueron mantenidos a una temperatura de 25 °C. Los ejemplares seleccionados estaban clínicamente sanos, con el peso y talla lo más uniforme posible. Durante la fase de aclimatación, los peces fueron mantenidos en acuarios de vidrio con capacidad 10 litros y alimentados *ad libitum* dos veces al día durante dos semanas. El agua de la pecera fue mantenida con un sistema de recirculación.

El día previo al ensayo, los peces no fueron alimentados

Ensayo preliminar seriado para determinar el potencial CL_{50} con sulfato de cobre

Se prepararon diez concentraciones distintas de sulfato de cobre: 2,50; 1,75; 1,50; 1,25; 1,00; 0,75; 0,50; 0,25; 0,125 y 0,625 mg/L. Luego, se enrazó a un volumen final de 500 mL con agua desgasificada de la marca San Luis.

Se utilizó como control agua desgasificada sin sulfato de cobre.

A cada concentración se le agregó seis peces Cebra por triplicado. Y se observó los resultados a las 24 horas de exposición (Figura 1).

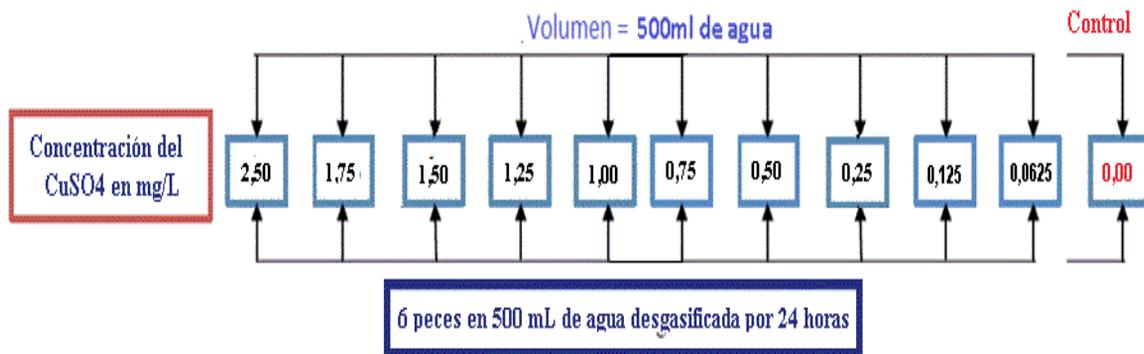


Figura 1. Ensayo preliminar para determinar el CL₅₀ del sulfato de cobre en peces Cebra a las 24 horas.

Selección de cinco concentraciones cercanas al CL₅₀ del sulfato de cobre a 24, 48, 72, 96 y 120 horas de exposición

Se prepararon cinco concentraciones distintas de sulfato de cobre (0.75, 0.50, 0.250, 0.1875 y 0.0625 mg/L).

Luego, se enrazó a un volumen final de 500 mL con agua desgasificada de la marca ®San Luis. A cada concentración se le agregó seis

peces Cebra cumpliendo con las 3 Rs de bioética con animales de experimentación (Rusel & Burch. 1959).

Se utilizó como control agua desgasificada sin sulfato de cobre.

A cada concentración se le agregó seis peces Cebra por triplicado. Y se observó los resultados a las 24, 48, 72, 96 y 120 horas de exposición (Figura 2).

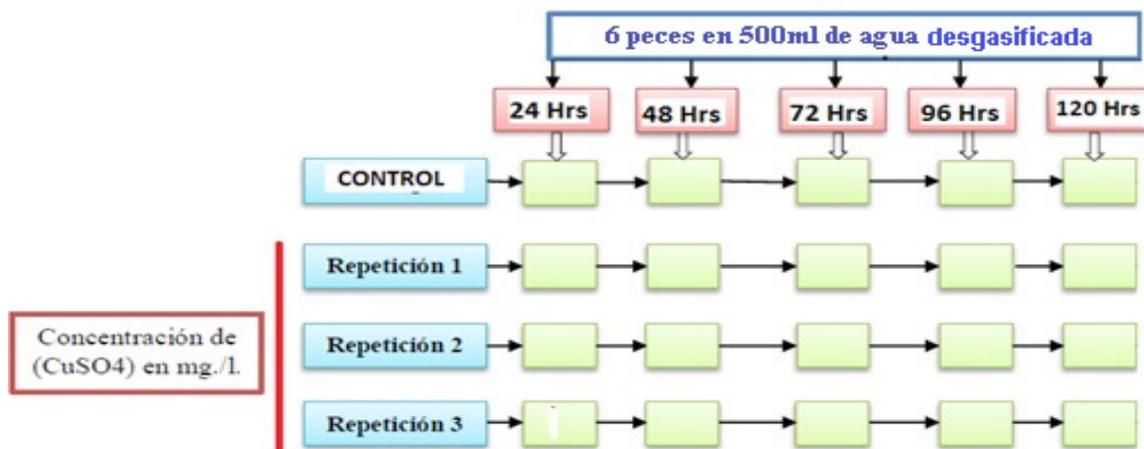


Figura 2. Ensayo final para determinar el CL₅₀ del sulfato de cobre en peces Cebra realizado a las 24, 48, 72, 96 y 120 horas de exposición.

Recolección de datos de mortandad

Por medio de observación directa se verificó cada 24 horas la secuencia de muerte de los peces que fue registrada diariamente hasta completar los cinco días de exposición, con el fin de determinar el CL₅₀ donde se produzca el 50% de mortandad.

Análisis estadístico de resultados

Se utilizó el programa de computación Probit 2013 para el análisis de datos, con el fin

de calcular la CL₅₀ mediante una regresión concentración-respuesta. La regresión Probit es un tipo particular de regresión lineal que se construye para conocer la relación que existe entre una variable independiente (la concentración de tóxico) y una variable dependiente (mortalidad) para una especie y un tiempo de exposición al tóxico (normalmente 48 o 96 horas). Para ello la respuesta acumulada de los organismos (mortalidad acumulada) se transforma a unidades probit (eje Y) y la concentración de tóxico se transforma logarítmicamen-

te (eje X). El resultado es una recta en la cual podemos interpolar el 50% de la respuesta y conocer qué concentración de tóxico causa esa respuesta (CL50). La CL50 o la concentración letal 50, es la concentración de tóxico necesaria para causar la muerte del 50% de la población de estudio en un tiempo determinado (Finney & Stevens, 1948).

Además, se determinó el Coeficiente de Correlación de los resultados de mortandad de los peces para verificar la consistencia de los mismos.

Resultados

En la Tabla 1 se muestra los resultados preliminares de peces Cebrá muertos versus peces cebrá vivos (n = 6) a las 24 horas de exposición con sulfato de cobre para determinar el CL₅₀.

Tabla 1
Resultados obtenidos del ensayo preliminar seriado para determinar el potencial CL₅₀ con sulfato de cobre.

Concentración de CuSO ₄ (mg/L)	Peces vivos y muertos a las 24 horas de exposición
2,5	6M/0V
1,75	6M/0V
1,50	6M/0V
1,25	6M/0V
1,00	6M/0V
0,75	6M/0V
0,50	6M/0V
0,25	5M/1V
0,125	1M/5V
0,0625	0M/6V
0,00*	0M/6V

M = Peces muertos, V = Peces vivos. (*) = Control



Figura 3. Batería de concentraciones de sulfato de cobre con peces Cebrá.

Se encontró que había 100% de animales vivos una concentración de 0,0625 mg/L y una mortalidad de cinco animales de seis en total (5M/6V) a una concentración de 0,25 mg/L. Por lo que, el CL₅₀ debe encontrarse en este rango de concentraciones.

Del ensayo preliminar se realizó un ensayo final cuyas concentraciones fueron: 0,5 (100% de mortalidad); 0,4; 0,3; 0,2; 0,1875 (posible 50% de mortalidad) y 0,1 mg/L (0% de mortalidad).

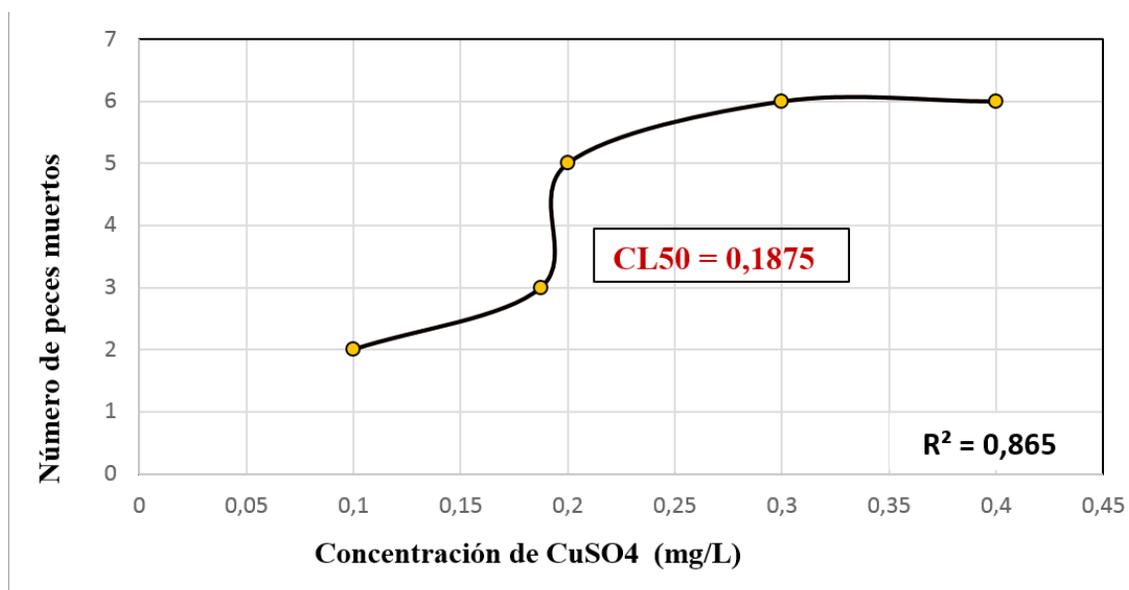
Tabla 2
Resultados obtenidos del ensayo preliminar seriado para determinar el potencial CL₅₀ con sulfato de cobre a concentraciones de 0,5; 0,4; 0,3; 0,2, 0,1875 y 0,1 mg/L.

Concentración de CuSO ₄ (mg/L)	Tiempo de exposición en horas (h)				
	24h	48h	72h	96h	120h
0,5	6M/0V	6M/0V	6M/0V	6M/0V	6M/0V
0,4	6M/0V	6M/0V	6M/0V	6M/0V	6M/0V
0,3	5M/1V	5M/1V	6M/0V	6M/0V	6M/0V
0,2	2M/4V	2M/4V	4M/2V	5M/1V	6M/0V
0,1875	1M/5V	1M/5V	2M/4V	3M/3V	4M/2V
0,1	0M/6V	0M/6V	1M/6V	2M/3V	2M/3V
0,00*	0M/6V	0M/6V	0M/6V	0M/6V	0M/6V

M = Peces muertos, V = Peces vivos. (*) = Control

En la Figura 3, se muestra la curva de Probit donde el coeficiente de correlación entre la concentración del sulfato de cobre y la mortalidad de peces Cebrá a las 96 horas de exposición fue de 0,1875mg/l con un coeficiente de correlación de 0,865.

Figura 4. Ensayo para determinar el grado de asociación entre el número de peces cebra muertos y la concentración del sulfato de cobre a las 96 horas de exposición.



Discusión

La CL₅₀ es útil en ecotoxicología para: (a) comparar sensibilidades entre diferentes especies para un mismo tóxico, (b) comparar toxicidad de varios compuestos para una misma especie, (c) evaluar el riesgo ambiental de los tóxicos y (d) usarlo como parámetro se suele utilizar en exposiciones cortas (agudas o a corto plazo), y por tanto, emplear concentraciones relativamente altas de tóxico (Boyd & Massaut, 1999).

En esta investigación se determina y evalúa mediante la obtención de la CL₅₀ para diferentes tiempos de exposición con sulfato de cobre. Este es un compuesto de bajo costo, muy usado principalmente para el tratamiento de ectoparásitos y enfermedades bacterianas, así como fungicida y herbicida (Reddy *et al.* 2006). Noga (1996) recomienda que para evitar efectos tóxicos, la dosis del sulfato de cobre debe ser inferior a 0,75 ppm. Sin embargo, en el presente informe se demostró que es necesaria tan solo la cuarta parte de dicha concentración para matar a la mitad de la población existente en un determinado lugar a 96 horas de exposición.

Los efectos de la toxicidad por sulfato de cobre evaluados permitirán su implementación dentro de un sistema de alerta de riesgo toxicológico utilizando al pez Cebra (*Danio rerio*) como un buen bioindicador de la toxicidad en poco tiempo y con poca destreza laboratorial.

Conclusiones

La CL₅₀ del sulfato de cobre hallada en el presente trabajo fue de 0.01875 mg/L.

El tiempo de exposición que tuvieron los peces para hallar la CL₅₀ fue de 96 horas.

Se determinó que el sulfato de cobre es tóxico para los peces cebra (*Danio rerio*).

Se implementó una nueva metodología rápida y de bajo costo para determinar el CL₅₀ en poblaciones de peces cebra donde se utiliza volúmenes pequeños (500mL) de agua mineral desgasificada y que puede ser implementada como un sistema de alerta de riesgo toxicológico a escala artesanal o de bajo presupuesto como son las condiciones en campo.

Referencias

- Boyd, C. & Massaut, L. (1999). Risk associated with use of chemicals in pond aquaculture. *Aquacultural Engineering*, 20, 113-132.
- Finney, D. J. & Stevens, W. L. (1948). A table for the calculation of working probits and weights in probit analysis. *Biometrika*, 35(1-2), 191-201.
- IQV. (2013). *Sulfato de cobre*. Recuperado de <http://www.iqvagro.com/0/productos/cobre/sulfato-de-cobre>
- Lozada, J., Palmeros, B., Ramírez, M. & Fernández, M. (2012). El pez cebra: una especie modelo. *Revista de divulgación científica y tecnológica de la universidad veracruzana*, 25, 1-4.
- Mendoza, R. (2009). Toxicidad aguda del sulfato de cobre en postlarvas de camarón. *Cryphiops caementarius*. *Archivos de Zootecnia*, 58(221), 103-110.
- Metcalf, E. (1995). *Ingeniería de aguas residuales. Tratamiento, vertido y reutilización* (3ª ed.). New York: McGraw-Hill.
- Montoya, J. (1981). *Pruebas de toxicidad aguda CL50 con algunos organoclorados, en dos especies continentales: mojarra amarilla (peteniakraussiisteindachner) y la tilapia (Rendalli boulenger) a partir de ensayos exploratorios* (Tesis profesional). Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano, Colombia.
- Noga, E.J. (1996). *Fish diseases, diagnosis and treatment*. St. Louis, Missouri: Mosby-Year Book, Inc.
- OMS. (1997). *Programa internacional de seguridad de sustancias químicas. seguridad química; principios básicos de toxicología aplicada. la naturaleza de los peligros químicos*. (2ª ed.). Lima, Perú: CEPIS.
- Reddy, R., Pillai, B. & Adhikari, S. (2006). Bioaccumulation of copper in postlarvae and juveniles of freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (de Man) exposed to sublethal levels of copper sulfate. *Aquaculture*, 252, 356-360.
- Rusel, W. M. S & Burch, R. L. (1959). *The principles of Humane Experimental Technique*. London, UK: Methuen.
- Velasco-Santamaría, Y.M., Gómez-Manrique, W. & Calderón-Bernal, J.M. (2006). Toxicidad aguda del sulfato de cobre (CuSO₄) en alevinos de cachama blanca (*Piaractus sbrachypomus*) bajo condiciones de aguas blandas. *Orinoquia*, 10(1), 64-70.