



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA
AGRICULTURA**

CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA

**TRABAJO DE TITULACIÓN, PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO
DE INGENIERO AGROPECUARIO**

**TEMA: EFECTO TERAPÉUTICO DE *Chlorella sp.* BIOTIPO 1 EN
TILAPIAS HÍBRIDAS (*Oreochromis sp.*) EXPUESTAS A CARBENDAZIM**

AUTOR: PAZMIÑO DOMÍNGUEZ, FELIPE EDMUNDO

DIRECTOR: PhD: ORTIZ TIRADO, JUAN CRISTÓBAL

SANGOLQUÍ

2018

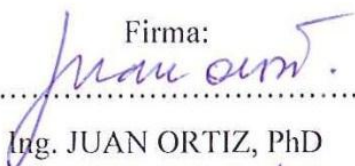


DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA

CERTIFICACIÓN

Certifico que el trabajo de titulación, “*EFECTO TERAPÉUTICO DE Chlorella sp. BIOTIPO 1 EN TILAPIAS HÍBRIDAS (Oreochromis sp.) EXPUESTAS A CARBENDAZIM*” fue realizado por el señor *Pazmiño Domínguez, Felipe Edmundo* el mismo que ha sido revisado en su totalidad, analizado por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto cumple con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, 9 de marzo de 2018

Firma:

.....
Ing. JUAN ORTIZ, PhD
C.C. 1709998163.....



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA

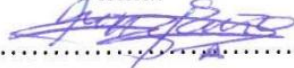
AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD

Yo, *Pazmiño Domínguez, Felipe Edmundo*, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: *Efecto terapéutico de Chlorella sp. biotipo 1 en tilapias híbridas (Oreochromis sp.) expuestas a carbendazim* es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Consecuentemente el contenido de la investigación mencionada es veraz.

Sangolquí, 9 de marzo de 2018

Firma:



Felipe Pazmiño

C.C.: 1717418329



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA

AUTORIZACIÓN

Yo, Felipe Edmundo Pazmiño Domínguez autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: Efecto terapéutico de Chlorella sp. biotipo 1 en tilapias híbridas (Oreochromis sp.) expuestas a carbendazim en el Repositorio Institucional cuyo contenido, ideas y criterios son de mi autoría y responsabilidad.

Sangolquí, 9 de marzo de 2018

Firma:

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Felipe Pazmiño', is written over a horizontal dotted line.

Felipe Pazmiño

C.C.: 1717418329

DEDICATORIA

A mi familia.

Mis padres Luis y Cristina.

Mi abuelita Eugenia Gaibor.

Mis hermanos Grace y Andrés.

AGRADECIMIENTO

A Dios, Jesucristo y al Espíritu Santo por ser la persona que me fortalece y acompaña en cada situación, bendiciendo mi camino.

A mi familia por su fe y sincero apoyo en este proyecto.

A la Carrera de Ingeniería Agropecuaria IASA I, docentes, compañeros, amigos, y todos los que conformaron esta prestigiosa facultad, durante mi vida estudiantil.

Al Dr. Manjunatha Bangeppagari, Ph.D. (Manju), por cada una de sus enseñanzas invaluable, y el apoyo fundamental para este proyecto.

Al Dr. Juan Ortiz Tirado, por la confianza en el proyecto.

A la Ing. Daysi Muñoz Sevilla por sus enseñanzas.

Al laboratorio de Microscopía electrónica y al grupo CENCINAT perteneciente a la Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE, por la apertura y compañerismo científico, al Dr. Arroyo, a la Ing. Andrea Vaca, y a la Ingeniera Audrey Beltrán por su paciencia colaboración y esfuerzo en una etapa importante para este estudio.

ÍNDICE DE CONTENIDO

CARÁTULA

CERTIFICADO DEL DIRECTOR.....	i
AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD	ii
AUTORIZACIÓN.....	iii
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTO	v
ÍNDICE DE CONTENIDO	vi
ÍNDICE DE TABLAS.....	ix
ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
ABSTRACT	xiii

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

1.1 Justificación.....	2
1.2 El Problema	4
1.2.1 Los Efectos	4
1.2.2 Las Causas	4
1.3 Objetivos.....	4
1.3.1 Objetivo general	4
1.3.2 Objetivos específicos.....	5
1.4 Hipótesis	5

CAPÍTULO II

REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Generalidades de carbendazim	6
2.2 Toxicidad de carbendazim.....	7
2.3 <i>Chlorella sp.</i>	10
2.4 Beneficios de las microalgas	10
2.5 Producción de biomasa.....	11
2.6 Tilapia.....	13
2.6.1 Biología de la especie	13

2.7	Hematología en peces	14
2.8	Histología	17

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1	Ubicación del lugar de la investigación	19
3.1.1	Ubicación política	19
3.1.2	Ubicación geográfica.....	19
3.1.3	Ubicación ecológica	19
3.2	Materiales y equipos.....	19
3.2.1	Materiales	20
3.2.2	Equipos.....	22
3.2.3	Reactivos	23
3.2.4	Organismos.....	25
3.3	Métodos	25
3.3.1	Aislamiento y masificación de <i>Chlorella sp.</i>	26
3.3.2	Evaluación toxicológica de <i>Chlorella sp.</i>	29
3.3.3	Elaboración del complemento de microalga.....	30
3.3.4	Ensayo de toxicidad aguda en tilapia	30
3.4	Diseño experimental	31
3.4.1	Factores.....	31
3.4.2	Tratamientos	32
3.4.3	Tipo de Diseño.....	32
3.4.4	Repeticiones.....	33
3.4.5	Unidades experimentales	33
3.4.6	Croquis experimental.....	33
3.5	Ensayo de toxicidad crónica	33
3.6	Variables a evaluar	35
3.6.1	Variables hematológicas	35
3.6.2	Análisis estadístico	37
3.6.3	Variables histológicas.....	39

3.6.4	Microscopía electrónica.....	40
3.6.4.1	Preparación de muestras microscopía de trasmisión.....	40
3.6.4.2	Elaboración de resinas.....	40
3.6.4.3	Tallado de resina	41
3.6.4.4	Seccionamiento	42
3.6.4.5	Tinción	43
3.6.4.6	Preparación de muestras microscopía de barrido MEB o SEM	43

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1	Pruebas de toxicidad de <i>Chlorella sp.</i> en <i>Artemia salina</i>	46
4.2	Establecimiento de la concentración letal media de carbendazim CL50 en el ensayo de toxicidad aguda en alevines de tilapia.....	47
4.3	Efecto terapéutico de la biomasa de <i>Chlorella sp.</i> , sobre la exposición de carbendazim en juveniles de tilapia híbrida	49
4.3.1	Hemoglobina	49
4.3.2	Hematocrito	51
4.3.3	Glucosa.....	52
4.3.4	Colinesterasa	55
4.3.5	Aspartato transaminasa (AST)	56
4.3.6	Alanina transaminasa (ALT).....	58
4.4	Mortalidad en porcentaje del efecto de <i>Chlorella sp.</i> y la exposición de carbendazim en juveniles de tilapia híbrida.	62
4.5	Variables histológicas	62
4.5.1	Tejido Branquial.....	62
4.5.2	Tejido hepático	64

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1	Conclusiones	66
5.2	Recomendaciones.....	67
5.3	Bibliografía.....	68

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	<i>Características generales de carbendazim</i>	6
Tabla 2	<i>Presentaciones de carbendazim</i>	7
Tabla 3	<i>Toxicidad aguda de carbendazim en diferentes organismos</i>	8
Tabla 4	<i>Características de los tratamientos aplicados en la investigación</i>	32
Tabla 5	<i>Características metodológicas de las variables hematológicas</i>	37
Tabla 6	<i>Análisis de varianza para un DCA bifactorial, con cinco tratamientos y tres repeticiones</i>	38
Tabla 7	<i>Clasificación de toxicidad CYTED</i>	46
Tabla 8	<i>Análisis probit (CL_{50}); Límites de confianza para concentración de carendazim (ppm) expuesto en tilapia híbrida (<i>Oreochromis sp.</i>)</i>	47
Tabla 9	<i>Pruebas de múltiples rangos LSD Fisher para hemoglobina</i>	49
Tabla 10	<i>Pruebas de múltiples rangos LSD Fisher para hematocrito</i>	51
Tabla 11	<i>Pruebas de múltiples rangos LSD Fisher para glucosa</i>	53
Tabla 12	<i>Pruebas de múltiples rangos LSD Fisher para colinesterasa sérica</i>	55
Tabla 13	<i>Pruebas de múltiples rangos LSD Fisher para aspartato transaminasa (AST)</i>	57
Tabla 14	<i>Pruebas de múltiples rangos LSD Fisher para alanina transaminasa (ALT)</i>	59
Tabla 15	<i>Medias de resultados hematológicos varios</i>	61
Tabla 16	<i>Medias de los resultados hematológicos en comparativa con estándares bibliográficos</i>	61
Tabla 17	<i>Vista de filamentos branquiales de tilapia híbrida mediante histología clásica H-E y microscopía electrónica de barrido SEM</i>	63
Tabla 18	<i>Vista del tejido hepático de tilapia híbrida mediante histología clásica H-E y microscopía electrónica de transmisión TEM</i>	64

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Requerimientos principales del cultivo de microalgas	12
Figura 2	Branquia de tilapia	17
Figura 3	Filamento branquial de tilapia H&E 40x	18
Figura 4	Vista macroscópica de hígado de tilapia H&E 10x	18
Figura 5	Esquema metodológico usado en el proyecto	25
Figura 6	<i>Chlorella sp.</i> Biotipo 1	26
Figura 7	Cultivo de <i>Chlorella sp.</i> , en diferentes fases de escalamiento	27
Figura 8	Conteo celular de microalga	28
Figura 9	Biomasa de microalga	28
Figura 10	Observación bioensayo de artemia	29
Figura 11	Materiales del complemento de microalga y pellets	30
Figura 12	Aplicación de carbendazim	31
Figura 13	Croquis experimental	33
Figura 14	Ejemplar juvenil de tilapia híbrida	34
Figura 15	Área experimental del ensayo	35
Figura 16	Extracción sanguínea de la vena caudal	35
Figura 17	Proceso de análisis fotométrico sanguíneo	36
Figura 18	Muestras sanguíneas preparadas para espectrofotometría	37
Figura 19	Placa histológica de tejido branquial de tilapia	39
Figura 20	Mezcla de resinas en muestras de tejido hepático de tilapia	41
Figura 21	Corte de tejido hepático a 100 nm en ultramicrotomo	42
Figura 22	Manipulación de Hexametildisilano (HDMS) en preparación de muestras para microscopía electrónica	44
Figura 23	Montajes de branquias en stubs	45
Figura 24	Observación de tejido hepático en microscopio electrónico	45
Figura 25	Modelo ajustado Probit de letalidad media en tilapia híbrida (n = 120) ($p \leq 0.05$)	48
Figura 26	Nivel de hemoglobina g/dL por tratamiento	50
Figura 27	Porcentaje de hematocrito por tratamiento	52
Figura 28	Nivel de glucosa en mg/dL por tratamiento	54

Figura 29 Nivel de colinesterasa sérica U/L por tratamiento.....	56
Figura 30 Nivel de aspartato transaminasa U/L por tratamiento	58
Figura 31 Nivel de alanina transaminasa U/L por tratamiento	60
Figura 32 Porcentaje de mortalidad por tratamiento.....	62

RESUMEN

El presente estudio muestra información relevante al uso de la microalga *Chlorella sp.* Biotipo 1, endémica del Ecuador, y su efecto terapéutico en juveniles de tilapia híbrida *Oreochromis sp.*, frente al ensayo toxicológico del fungicida carbendazim. Se analizó la toxicidad aguda en alevines de tilapia híbrida exponiéndolos durante cinco días al fungicida, registrando mortalidad (CL_{50}) a una concentración letal media de 7.5 ppm de carbendazim. Se determinó que el nivel de toxicidad de la microalga *Chlorella sp.*, biotipo 1 es relativamente inocua según la normativa CYTED 1993. Durante 21 días, noventa juveniles de tilapia (n=90) fueron desafiados por triplicado a diferentes concentraciones de carbendazim: T1 (control), T2 (0.5 ppm carbendazim + *Chlorella sp.*), T3 (0.75 ppm carbendazim + *Chlorella sp.*), T4 (0.5 ppm carbendazim), T5 (0.75 ppm carbendazim). Al concluir el ensayo, se analizaron las variables hematológicas: hemoglobina (g/dL), hematocrito (%), glucosa (mg/dL), colinesterasa (U/L), en las variables expuestas se detectaron diferencias estadísticas ($p < 0,05$) con el control. Para este estudio se evidenció un daño toxicológico de carbendazim a nivel de hematología sanguínea e histología clásica, así como una disminución en los daños tóxicos por la presencia en la dieta de la microalga *Chlorella sp.*, en el modelo biológico de tilapia híbrida.

PALABRAS CLAVE

- MICROALGA
- CARBENDAZIM
- MODELO BIOLÓGICO
- TOXICIDAD

ABSTRACT

The present study shows information relevant to the use of microalga *Chlorella sp.* Biotype 1, endemic from Ecuador, and his therapeutic effect in juvenile hybrid tilapia *Oreochromis sp.*, against toxicological test of the fungicide carbendazim. The response of hematological levels presented by biological model and alterations in branchial and hepatic tissue was investigated. The acute toxicity in hybrid tilapia fingerlings was analyzed by exposing them for five days to fungicide, recording mortality (LC₅₀) at median lethal concentration of 7.5 ppm carbendazim. Toxicity of *Chlorella sp.*, biotype 1, it was determined like innocuous according CYTED 1993. During 21 days, ninety juvenile tilapia (n = 90) were challenged in triplicate at different concentrations of carbendazim: T1 (control), T2 (0.5 ppm carbendazim + *Chlorella sp.*), T3 (0.5 ppm carbendazim + *Chlorella sp.*), T4 (0.5 ppm carbendazim), T5 (0.75 ppm carbendazim). Hemoglobin (g/dL), hematocrit (%), glucose (mg/dL), cholinesterase (U/L), For this study a poison carbendazim damage blood level hematology and histology classical, as well decrease in toxic damage by the presence in the diet of the microalgae *Chlorella sp.*, evidenced in the biological model of hybrid tilapia.

KEYWORDS

- **MICROALGAE**
- **CARBENDAZIM**
- **BIOLOGICAL MODEL**
- **TOXICITY**

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

La aplicación de cualquier producto químico a un cultivo o alimento plantea la interrogante de los riesgos y beneficios. Esta discusión del riesgo ha pasado de tratar la toxicidad del usuario y consumidor a un enfoque mucho más amplio que incluye todo el ambiente y el ecosistema en el que los cultivos se desarrollan. En diciembre de 2007, UN-FAO, IR-4 y la EPA celebró una cumbre para establecer las zonas mundiales de residuos y requisitos normalizados de datos. En general, la mayoría de los análisis concluyen que los beneficios de los fungicidas superan con creces los riesgos, si se utilizan con cuidado y de acuerdo con las recomendaciones de la etiqueta (Schlundt, 2002).

Es importante para el control sostenible de enfermedades, la integración inteligente de tecnologías como biopesticidas, resistencia genética y fungicidas químicos, usadas con medidas adecuadas mediante un criterio cultural y sanitario. Los productos de biocontrol contribuyen con menos del uno por ciento del mercado de fungicidas (Collins, 2007); Indudablemente contribuirán más en el futuro, sin embargo, este equilibrio entre la resistencia genética y los productos de control de enfermedades de naturaleza química, bioquímica o biológica permanecerán y no es probable que cambie drásticamente en un futuro próximo.

Una población mundial cada vez mayor que quiere alimentarse mejor, conducirá a un aumento de las áreas de cultivo intensivo, por lo tanto, un mayor uso de fungicidas (Collins, 2007).

Las microalgas han sido ampliamente utilizadas como nuevas fuentes de sustancias bioactivas. Son ricas en diversos fitoquímicos como carotenoides, alcaloides, compuestos

fenólicos, aminoácidos, ácidos grasos poliinsaturados y polisacáridos sulfatados (Herrero & Ibanez, 2006).

Estos compuestos proporcionan excelentes y diversas acciones biológicas, incluyendo efectos antioxidantes, antimicrobianos, antivirales, antitumorales, antiinflamatorios y antialérgicos. Su beneficio saludable parece ser debido a los diferentes mecanismos bioquímicos. Sin embargo, los géneros *Chlorella*, *Spirulina* y *Dunaliella* se han utilizado en diversas áreas en productos nutracéuticos, farmacéuticos, cosméticos, nutricionales y de calidad funcional en los alimentos.

En 2006, la Organización Mundial de la Salud describe a *Spirulina* como uno de los superalimentos, lo que ejemplifica el potencial de las microalgas. Esta revisión proporciona información sobre los usos actuales y futuros de las microalgas como nueva fuente de compuestos promotores de la salud (El Baky, 2010).

El presente estudio propone la investigación de recursos con potencial antioxidante y de componentes con riesgo ambiental y humano, planteando un ensayo de toxicología crónica del fungicida carbendazim, frente a la administración de la microalga andina *Chlorella sp.*, en tilapia, como un modelo biológico, para evaluar si existen posibles daños en órganos y cambios en la química y actividad enzimática sanguínea.

1.1 Justificación

Carbendazim es un fungicida sistémico perteneciente al grupo de los benzimidazoles, que desempeña un papel importante en el control de las enfermedades en cultivos herbáceos, frutas, verduras y plantas ornamentales. También se utiliza en pos cosecha y en tratamientos preventivos de semillas. El volumen de venta de carbendazim en el mercado global es mayor a doscientos millones de dólares, equivalente a más de doce mil toneladas de ingrediente activo. Los reportes

bibliográficos muestran que carbendazim es un compuesto químico peligroso, causante de malformaciones en el feto de animales usados como modelos biológicos. Carbendazim es capaz de interrumpir la separación de los cromosomas, puede causar infertilidad y posiblemente cáncer. En ensayos de residualidad en frutos en los cuales se usa este compuesto se ha demostrado, que de dos a cuatro por ciento de las pruebas superan los límites máximos permitidos para carbendazim en frutos: pepinos (*Cucumis sativus*), mandarinas (*Citrus reticulata*), peras (*Pyrus communis*) y naranjas (*Citrus sinensis*) (Muilerman, 2016).

Chlorella vulgaris es una microalga verde unicelular que ha sido ampliamente utilizada como fuente de alimento, con nutrientes completos, como carbohidratos, proteínas, vitaminas y minerales, se comercializa como complemento terapéutico o incorporado en los alimentos (Balseca, 2015). Estudios realizados han demostrado las propiedades anti-aterogénicas, anti-colesterolémicas, anti-inflamatorios y anti-tumorales de *C. Vulgaris* (Shawkat, 2014).

Según Mihae (2016) en un estudio realizado con microalgas del alto andino ecuatoriano del género *Chlorella* y *Synechosistys*, se determinó a estas microalgas, como fuente de antioxidantes extraíbles con múltiples aplicaciones, que pueden proporcionar nuevos productos con un alto impacto nacional e internacional del mercado farmacéutico, cosmético y alimentario.

Tilapia (*Oreochromis sp.*) es un pez teleósteo con una distribución mundial; por lo tanto es un buen modelo biológico de evaluación de los ecosistemas acuáticos y de estudios eco toxicológicos. Un estudio comparativo de cinco especies mostró que tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*) presenta un sistema inmune fuerte que proporciona a esta especie una buena capacidad para tolerar las tensiones bióticas y abióticas (Lichtenthaler, 1987).

Basado en los criterios previamente presentados, la investigación evaluará el efecto terapéutico de *Chlorella sp.*, sobre el ensayo toxicológico con carbendazim en juveniles de tilapia

(*Oreochromis sp*), para determinar las posibles afectaciones en parámetros hematológicos e histológicos.

1.2 El Problema

El uso de carbendazim genera contaminación ambiental, afectando la biota acuática y generando efectos negativos en peces a nivel hepático, desarrollo reproductivo, entre otros. En el ser humano, es posible el desarrollo de carcinogénesis y toxicidad crónica de dicho compuesto.

1.2.1 Los Efectos

Los daños por toxicidad de fungicidas en organismos acuáticos (peces, moluscos, macro invertebrados, otros). Y efectos tóxicos a largo plazo en personas que tengan contacto con aguas contaminadas con el químico.

1.2.2 Las Causas

El uso excesivo y manejo deficiente de desechos pesticidas, como la residualidad de carbendazim, que presenta excedentes frente a los límites máximos permitidos en frutas y productos comestibles.

La falta de conocimiento, de los peligros que presentan los fungicidas para el medioambiente, la salud animal y humana.

Escasa información de carbendazim en toxicología crónica a largo plazo, así como un reducido número de estudios en las propiedades terapéuticas de microalgas en el Ecuador.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo general

- Evaluar el efecto terapéutico de la microalga andina *Chlorella sp.* biotipo 1 en aguas expuestas a carbendazim y su impacto en el bienestar de tilapia híbrida (*Oreochromis sp.*).

1.3.2 Objetivos específicos

- Determinar la toxicidad de carbendazim y su grado de afectación hematológico e histológico en juveniles de tilapia (*Oreochromis sp.*)
- Analizar el efecto terapéutico de la microalga andina *Chlorella sp.* biotipo 1, incluida en la dieta balanceada para tilapias expuestas a carbendazim.

1.4 Hipótesis

H₀: “El uso de algas endémicas como *Chlorella sp.* Biotipo 1 no presenta un efecto terapéutico en peces del género *Oreochromis sp.* expuestas con el fungicida carbendazim.”

H₁: “El uso de algas endémicas como *Chlorella sp.* Biotipo 1 presenta un efecto terapéutico en peces del género *Oreochromis sp.* expuestas con el fungicida Carbendazim.”

CAPÍTULO II

REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Generalidades de carbendazim

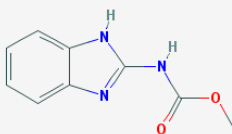
Carbendazim es un fungicida sistémico de amplio espectro perteneciente al grupo de los bencimidazoles, carbamatos. Es un metabolito de otros compuestos como benomyl y tiofanatometil, también es conocido como carbendasime carbendazol, BCM, MBC, etc. En estado puro presenta un porcentaje del 97%, con un color blanquecino y sin olor (WHO FAO, 1996).

Tabla 1

Características generales de carbendazim

Número CAS	10605-21-7
Número PubChem	25429
Nomenclatura IUPAC	2-metaxicarbamoil-bencimidazol
Fórmula molecular	C ₉ H ₉ N ₃ O ₂
Peso molecular	191.19 g/mol
Solubilidad en agua	0.0008 g/100ml a 24°C:
Densidad	0.27 g/cm ³

Estructura en 2D



Fuente: (NCBI, 2016)

El fungicida sistémico carbendazim presenta actividad preventiva y curativa, de acción rápida en las plantas. Es absorbido por raíces y tejidos verdes y traslocado en sentido acropétalo. Actúa sobre los organismos fúngicos interfiriendo la biosíntesis de ADN durante la mitosis y en

el mecanismo de transmisión del mensaje genético del ADN al ARN. Impide el desarrollo de hifas, formación de apresorios y crecimiento del micelio. Detiene el desarrollo del tubo germinativo provocando irregularidades en la división celular y dando lugar a células anormales que provocan la muerte del hongo. Posee actividad secundaria sobre huevos de ácaros y contra oídios (WHO, 1999).

Tabla 2

Presentaciones de carbendazim

Presentación	Concentración
Suspensión concentrada	500g/L
Polvo mojable	500g/kg
Dispersión acuosa	500g/L
Suspensión acuosa	200g/L
Líquido soluble en agua como fosfato	7g/L

Fuente: (WHO FAO, 1996)

2.2 Toxicidad de carbendazim

La Toxicidad aguda de carbendazim está clasificado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como poco probable, en su uso normal (WHO, 1999).

La principal fuente de exposición al carbendazim para el público en general es la ingesta dietética. Para los trabajadores agrícolas, la exposición ocupacional durante la fabricación o el uso se considera dentro de niveles aceptables. El Programa Internacional para la Seguridad Química (IPCS) indica que no existe peligro de exposición al carbendazim durante su producción y uso en la agricultura. Dado que los trabajadores son más propensos a sufrir exposición por contacto con la piel o inhalación, el riesgo puede controlarse mediante el uso de ropa de protección y se recomienda el uso de una máscara contra polvo (WHO FAO, 1996).

Tabla 3*Toxicidad aguda de carbendazim en diferentes organismos*

Nombre						
común	Nombre científico	Edad	Tiempo	Dosis	Toxicidad	Unidades
Codorniz	<i>Colinus virginianus</i>	6 mes	14 d	LD50	2250	mg/kg
Codorniz	<i>Colinus virginianus</i>	14 d	8 d	LC50	10000	ppm
Pato						
Mallard	<i>Anas platyrhynchos</i>	14 d	8 d	LC50	10000	ppm
Bagre de canal	<i>Ictalurus punctatus</i>	0.8 g	96 h	LC50	19	ppb
Bagre de canal	<i>Ictalurus punctatus</i>	1.3 g	96 h	LC50	10	ppb
Bagre de canal	<i>Ictalurus punctatus</i>	Juvenil	96 h	LC50	12	ppb
Bagre de canal	<i>Ictalurus punctatus</i>	Juvenil	96 h	LC50	7.41	ppb
Carpa	<i>Pimephales promelas</i>	0.7 g	96 h	LC50	10000	ppb
Trucha arcoíris	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	0.9 g	96 h	LC50	650	ppb
Trucha arcoíris	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Alevín	96 h	LC50	370	ppb
Trucha arcoíris	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Juvenil	96 h	LC50	320	ppb
Trucha arcoíris	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Ovas	96 h	LC50	145	ppb
Codorniz	<i>Colinus virginianus</i>	19 d	14 d	LD50	2100	mg/kg
Codorniz	<i>Colinus virginianus</i>	14 d	8 d	LC50	4200	ppm
Pato						
Mallard	<i>Anas platyrhynchos</i>	9 d	8 d	LC50	4467	ppm
Pez luna azul	<i>Lepomis macrochirus</i>	0.6 g	96 h	LC50	1850	ppb
Trucha arcoíris	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	2.7 g	96 h	LC50	1320	ppb
Pulga de agua	<i>Daphnia magna</i>	24 h	48 h	EC50	110	ppb
Abeja	<i>Apis mellifera</i>	Obrera	48 h	LD50	50	ugb
Trucha arcoíris	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	0.8 g	96 h	LC50	230	ppb
Pulga de agua	<i>Daphnia magna</i>	24 h	48 h	EC50	350	ppb
Ostra oriental	<i>Crassostrea virginica</i>	Larva	96 h	EC50	1145	ppb

CONTINÚA



Camarón mísido	<i>Americamysis bahia</i>	24 h	96 h	LC50	98	ppb
Pez de cabeza de oveja	<i>Cyprinodon variegatus</i>	-	96 h	LC50	1158	ppb
Pulga de agua	<i>Daphnia magna</i>	Nauplio	21 d	LOEC	6.6	ppb
Camarón mísido	<i>Americamysis bahia</i>	Nauplio	28 d	LOEC	50.4	ppb
Trucha arcoíris	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Juvenil	79 d	LOEC	34	ppb
Bagre de canal	<i>Ictalurus punctatus</i>	Juvenil	-	LOEC	3.2	ppb
Pulga de agua	<i>Daphnia magna</i>	Cisto	21 d	LOEC	25	ppb
Pez cabeza de oveja	<i>Cyprinodon variegatus</i>	-	96 h	LC50	1158	ppb
Abeja	<i>Apis mellifera</i>	Adulto	48 h	LD50	48.34	ugb

Fuente: (EPA, 2016)

Investigaciones en ratones, mostraron tumores aumentados en dos de cada tres estudios. Sin embargo, al examinar otros datos, el Comité Científico de Plantas mostró que no había ningún efecto reactivo del ADN, por lo que concluyeron que "estos tumores hepáticos de ratón no podían interpretarse como predicción de un riesgo carcinogénico para los seres humanos" (SCP, 2001).

Sin embargo, carbendazim es un posible disruptor endocrino, por lo que la Comisión Europea la incluyó en una lista prioritaria de sustancias químicas que se cree afectan a la función hormonal (CEC, 1999).

Carbendazim puede interrumpir el desarrollo de esperma y dañar el desarrollo testicular en ratas adultas. Por ejemplo, un estudio de benomyl (que tiene carbendazim como su principal metabolito) encontró fetotoxicidad, atrofia y degeneración testicular (Du Pont, 1991).

Cabe recalcar que el fungicida en estudio no es mutagénico hereditario, sin embargo, afecta a los cromosomas. Los investigadores que probaron el efecto del carbendazim en linfocitos humanos cultivados, concluyeron que carbendazim provoca aneugénesis (afecta al número de

cromosomas). Esto se debe a la inhibición de la polimerización de la tubulina, la proteína que es esencial para la segregación de los cromosomas durante la división celular (Min & Kang, 2008).

2.3 *Chlorella* sp.

Es una microalga verde de forma redonda o elipsoidal, la cual crece en forma de células simples. La pared celular es rígida y contiene glucosamina, posee un cloroplasto lateral con pirenoide carente. Su reproducción es asexual sólo por autoesporas. Tradicionalmente, del género *Chlorella* se conoce más de 100 especies, sin embargo, 10 especies han sido bien establecidas (Garofalo, 2011).

Pertenece a la división Chlorophyta, clase *Chlorophyceae*. Se ha cultivado en forma intensiva con fines de alimentación y obtención de metabolitos (Eric, 2012). Esta microalga se puede producir a través de tecnologías de bajo costo y su perfil nutricional está bien documentado. El sistema de producción por lote es el más utilizado a gran escala por su bajo riesgo de contaminación y fácil implementación (Furuya, 2010).

Chlorella tiene una alta concentración de clorofila, su capacidad de fotosíntesis es muchas veces mayor que la de las plantas, puede dividirse en cuatro células cada 20 horas. Además las investigaciones con esta microalga han demostrado que la biomasa puede ser usada para la formulación de alimento funcional para animales, como biofertilizante y para biorremediación de aguas contaminadas (Kanno & Kazie, 2005).

2.4 Beneficios de las microalgas

Las microalgas presentan un proceso eficiente de fotosíntesis, que proporciona un mecanismo para reducir las emisiones de CO₂ por lo tanto esta fuente de carbono es útil para el cultivo de microalgas. Además de la eliminación de CO₂, éstas generan metabolitos que pueden

utilizarse para aplicaciones como productos farmacéuticos, alimentación funcional en acuicultura y biocombustibles. (Pokniak, 2007).

La gran variedad de componentes químicos en *Chlorella* la convierten en una buena fuente de carbohidratos, proteínas y vitaminas. La microalga puede utilizarse como fuente de proteína cruda (Muilerman, 2016) o como suministro de ácidos grasos y vitaminas para peces en acuicultura (Buenaño, 2010).

Cabe destacar que la fotosíntesis de células vegetales, incluyendo microalgas, están expuestas a una combinación de luz intensa y altos niveles de oxígeno. Esto produce un daño foto-oxidativo, generando radicales libres y daños en las células vegetales. La ausencia de tales daños en microalgas sugiere que estas células poseen protección, mecanismos y compuestos antioxidantes. Se ha demostrado que los carotenoides protegen las células algales del daño foto-oxidativo (Lichtenthaler, 1987).

2.5 Producción de biomasa

Para la obtención de la biomasa de *Chlorella sp.*, es recomendable preparar medio de cultivo con una concentración 4 mili molar de nitrógeno, a partir de un fertilizante comercial, distribuirlo en recipientes de vidrio y esterilizarlos en autoclave para inocular 1×10^6 ufc de microalgas de una suspensión de un cultivo puro de la cepa de *Chlorella sp.* (Salinas, 2015).

Estudios previos han demostrado que con el uso de fertilizantes agrícolas se obtiene un mayor crecimiento, una similar composición proximal y un menor costo que con aquellos medios que son específicos para el cultivo de microalgas (Balseca, 2015).

Según Camacho *et al.*, (2009), las condiciones del cultivo deben semejarse al ambiente natural de la microalga y debe tener los siguientes componentes:



Figura 1 Requerimientos principales del cultivo de microalgas

Fuente: (Collins, 2007)

Temperatura: las microalgas toleran temperaturas entre 16 y 27°C, aunque esto puede variar de acuerdo a la composición del medio de cultivo o la especie cultivada. Un valor intermedio de 18-20°C es frecuentemente empleado. Temperaturas por debajo de los 16°C pueden retardar el crecimiento, mientras que aquellas por arriba de los 35°C son letales para cierto número de especies (Collins, 2007).

Luz: como en plantas terrestres, la luz es la fuente de energía que promueve las reacciones fotosintéticas en algas. Por lo general se recomienda un fotoperiodo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad (Herrero & Ibanez, 2006).

PH: El rango del pH para la mayoría de las especies de algas cultivadas es entre 7 y 9, siendo el rango óptimo 8.2-8.7. Para mantener un pH aceptable es necesario airear el medio de cultivo (Infante, 2012).

Aireación: La aireación es necesaria para prevenir la sedimentación de algas, para asegurar que todas las células de la población están igualmente expuestas a la luz y los nutrientes, y para mejorar el intercambio de gases entre el medio de cultivo y aire (Camacho, 2009).

Los cultivos de *Chlorella sp.*, se recomienda mantenerlos a 30°C, con aireación y en presencia de luz con un foto-período de 12:12 h, para favorecer el crecimiento del microorganismo. Se deben mantener en agitación mediante bombas de aire que proporcionen 2.25 litros O₂/min para evitar la sedimentación de las algas y permitir su homogenización en tanques de cultivo. Se debe evaluar la concentración celular por espectrofotometría o conteo celular para determinar cuando el cultivo alcance la fase estacionaria y sea necesario centrifugar y secar para obtener la biomasa (Herrero & Ibanez, 2006).

2.6 Tilapia

Tilapia se encuentra catalogada dentro del grupo de peces con mayor futuro en cultivos comerciales ya que su período de crecimiento es relativamente más corto al de otras especies y presenta alta adaptabilidad a diferentes ambientes de producción (Castro & Aguilar, 2004).

2.6.1 Biología de la especie

Es una especie tropical omnívora que habita en aguas superficiales. No tolera temperaturas menores 12°C, ni superiores a 42°C, el rango de temperatura ideal varía entre 31 y 36°C. Se alimenta de fitoplancton, plantas acuáticas, pequeños invertebrados, fauna béntica, entre otros (FAO, 2005).

Alcanza la madurez sexual a los 6 meses, la hembra desova en el nido y tras la fertilización por el macho, recoge los huevos en su boca y los incuba durante un período de alrededor de 2 semanas. Un pez hembra de 100 gramos puede desovar aproximadamente 100 huevos. Puede vivir más de 10 años y alcanzar un peso de 5 kilogramos (FAO, 2005).

Los alevines pueden estabularse a una tasa de 300 peces/metro³ y criarlos por 6 semanas hasta alcanzar un peso promedio de 10 gramos. Los peces de esta talla pueden ser estabulados una vez más a una densidad de 250 peces/metro³ para producir alevines de 25 a 30 gramos en 4

semanas. Estos peces podrán sembrarse a una densidad de 150 peces/metro³ para producir alevines de 50 a 60 gramos en 4 semanas. Un sistema de recirculación para un cultivo a densidad de 100 peces/metro³, permitirá producir alevines de 50 gramos en 12 semanas. Los peces deben alimentarse 3 o 4 veces por día (FAO, 2016).

Las exigencias nutricionales de los alevines son iguales a la de las tilapias en términos cualitativos, sin embargo en términos cuantitativos, las exigencias son mayores en peces jóvenes que en adultos (Torres & Hurtado, 2011).

Los requerimientos de proteína bruta para las fases de reversión, post reversión hasta 100 gramos y mayor de 100 gramos son de 41,30; 29,73 y 26,8% respectivamente para un óptimo rendimiento (Furuya, 2010).

2.7 Hematología en peces

El análisis hematológico se presenta como un valioso instrumento de diagnóstico de enfermedades, deficiencias y cambios medio ambientales, en peces que viven en un ambiente natural o en confinamiento (Castro & Aguilar, 2004).

El fluido sanguíneo está compuesto por una parte líquida (el plasma) y otra sólida (las células), con un volumen 2-4% del peso corporal del pez, otros vertebrados difieren en este porcentaje ente 5-8% (Yigit & Keser, 2016).

El plasma proteico en los peces difiere al de los mamíferos como menciona Eric (2012) siendo este menor en comparación. En peces, la circulación sanguínea está estrechamente ligada a la respiración, siendo los glóbulos rojos y el pigmento que contienen (hemoglobina), los que distribuyen el oxígeno por todo el cuerpo. La hemoglobina es un componente complejo constituido por proteína y un compuesto férrico no proteínico, fácilmente oxidable. Se deduce

que en los peces nadadores rápidos tienen gran cantidad de estos, mientras que en nadadores lentos su proporción es menor.

Hematocrito es el porcentaje que ocupa la fracción sólida de una muestra de sangre anti-coagulada, al separarse de su fase líquida. Está determinado casi enteramente por el volumen que ocupan los glóbulos rojos. Existe una correlación entre hematocrito y hemoglobina puesto que está relacionado con el hábitat de los peces y su actividad, la variación de este parámetro se debe a las adaptaciones fisiológicas que presentan los organismos (Ucros, 2009).

Glucosa es el azúcar simple más importante en el metabolismo animal. La glucosa se llama un azúcar simple o un monosacárido, porque es una de las unidades más pequeñas que tiene las características de esta clase de hidratos de carbono. Puede existir variación en este parámetro por el cambio nutricional o puede también considerarse un indicador secundario de estrés de adaptación del metabolismo intermedio variando al aumentar la glucosa plasmática a partir del glucógeno del hígado (glucogenolisis) y la síntesis de nueva glucosa a partir de ácidos grasos libres en tejido adiposo (lipolisis y glucogénesis) (Garofalo, 2011).

Las proteínas circulantes se sintetizan en forma predominante en el hígado, aunque también contribuyen en su producción las células plasmáticas. Cuantitativamente la proteína más importante es la albúmina (30-50% de la concentración total de proteínas séricas), al resto se les conoce como globulinas (Kanno & Kazie, 2005). La albúmina es la proteína de mayor concentración en el plasma y transporta muchas moléculas pequeñas en la sangre (como bilirrubina, calcio, progesterona y drogas). En cuanto a las proteínas totales, en los peces en general sus niveles también pueden estar disminuidos debido a daño renal, inanición, daño hepático (Castro & Aguilar, 2004) y septicemia, tal como ocurre en la infección por aeromonas (Abdulrahman, 2014).

La creatinina en peces al igual que en mamíferos es producida a nivel muscular y excretada a nivel renal (Plaza, 2010).

La creatinina es mejor indicador que la urea en enfermedades renales, ya que es eliminada mediante filtración glomerular (Sarmiento & Torre, 2011).

Las enzimas indicadoras de daño hepático en peces son: alanino amino transferasa (ALT) la cual aumenta en necrosis hepática, aspartato amino transferasa (AST) y glutamato deshidrogenasa (GLDH).

La AST también conocida como transaminasa glutámico-oxalacética, GOT y SGOT, utiliza aspartato como sustrato, se encuentra localizada además del citoplasma y las mitocondrias de las células hepáticas, en la célula cardíaca, tejido muscular esquelético, en el riñón, y en menor grado en otros tejidos al existir daño hepático se produce un incremento de ambas a nivel plasmático, sin embargo, el nivel de estas enzimas no es tan elevado en enfermedades crónicas del hígado (Mahmood & Parry, 2001).

La fosfatasa alcalina (FA) es una enzima que se encuentra en todos los tejidos. Los tejidos en que su concentración es muy alta son, el hígado, los conductos biliares y las células óseas. No obstante, la fosfatasa alcalina en suero también se eleva en algunas circunstancias normales (por ejemplo, durante el crecimiento normal del hueso) o como respuesta a diversas drogas (Du Pont, 1991).

El papel biológico principal de la acetilcolinesterasa (AChE) y la butirilcolinesterasa (BChE) es la regulación de la transmisión del impulso nervioso por hidrólisis del neurotransmisor acetilcolina. Es un marcador que se ha utilizado durante años para controlar los efectos de los plaguicidas, como los compuestos organofosforados y carbamatos, tanto en organismos terrestres como de agua dulce (WHO, 1999).

2.8 Histología

Las branquias son órganos que se encuentran en cámaras ubicadas simétricamente a ambos lados del cuerpo, detrás de la cabeza. La macro arquitectura de la branquia de tilapia se puede delimitar a dos regiones bien definidas: el arco branquial y los filamentos (B). Del arco se originan dos hileras de filamentos (AB) (Figura 2).

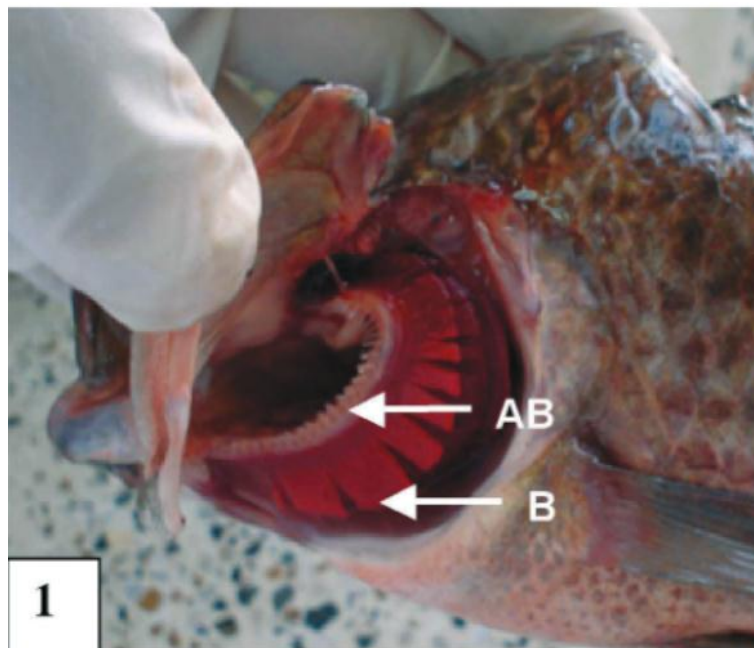


Figura 2 Branquia de tilapia

Fuente: (Torres et al., 2010)

En el tejido branquial existe la presencia de las células caliciformes secretoras de mucina, la cual forma una película de protección mecánica para el epitelio, creando una interface entre el ambiente acuoso y el tejido, además, participan en la regulación iónica y protección inmunológica, actuando como barrera contra agentes patógenos y sustancias tóxicas (Ferguson, 2006) (Figura 2). Especialmente en la base de la lamela y en el epitelio opercular, se encuentran la célula osmo reguladora de cloro, rica en mitocondrias, secreta NaCl a través de un gradiente electroquímico producido por la acción de una ATPasa a^{+}/K^{+} , participando en el balance ácido base y procesos de aclimatación (Buenaño, 2010).

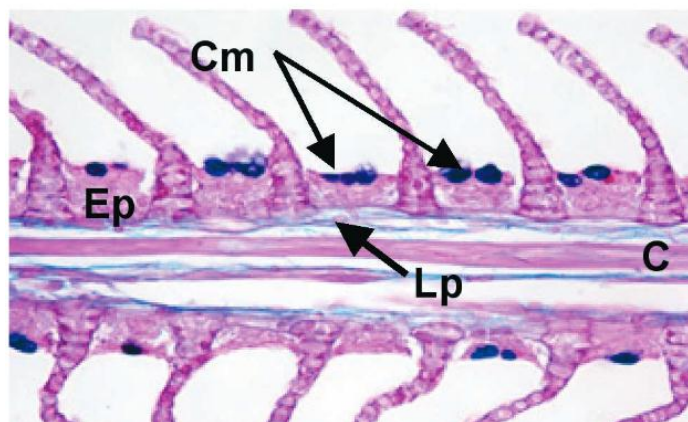


Figura 3 Filamento branquial de tilapia H&E 40x

Fuente: (Hernández, 2015)

El hígado en los peces realiza funciones que los mamíferos hacen por separado con el hígado y el páncreas. En la tilapia el hígado se localiza en la región media y anterior de la cavidad abdominal, se divide en lóbulos que se relacionan con el intestino a lo largo de la cavidad (Figura 4)

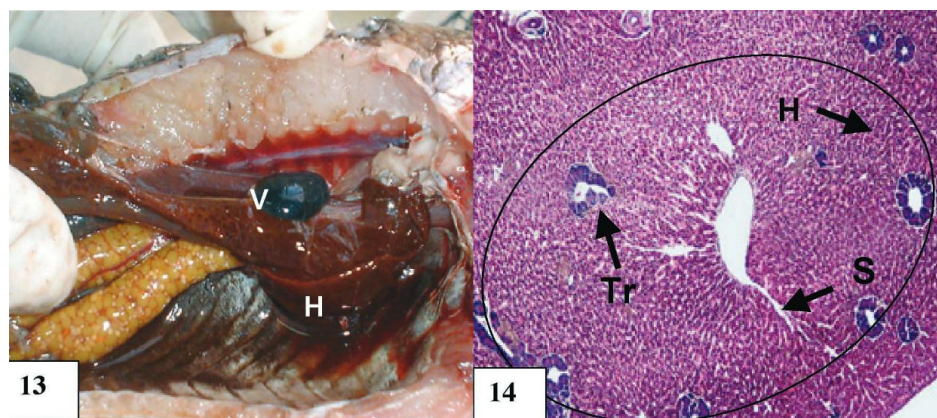


Figura 4 Vista macroscópica de hígado de tilapia H&E 10x

Fuente: (Hernández, 2015)

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Ubicación del lugar de la investigación

3.1.1 Ubicación política

El presente estudio se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Acuicultura y Recursos Acuáticos e invernadero cuarentenario, ubicado en la Hacienda El Prado – IASA I, perteneciente a la Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE, parroquia Sangolquí, cantón Rumiñahui, provincia de Pichincha.

3.1.2 Ubicación geográfica

El Laboratorio de Acuicultura y Recursos Acuáticos se encuentra en las coordenadas geográficas: Longitud 78°24'44''O, latitud 0°23'20''S.

3.1.3 Ubicación ecológica

La Hacienda El Prado se encuentra en la zona de vida bosque húmedo montano, a una altitud de 2748 msnm, tiene una temperatura promedio anual de 13,89 °C, una precipitación de 1285 mm/año, y humedad relativa promedio de 69,03% (Sarmiento & Torre, 2011).

Cabe mencionar que el presente estudio se realizó en el invernadero cuarentenario, bajo condiciones ambientales controladas.

3.2 Materiales y equipos

Los materiales, equipos, reactivos y organismos empleados en el presente proyecto de investigación fueron:

3.2.1 Materiales

- Paquete de algodón.
- Paquete de gasa.
- 10 tubos de ensayo de 5 ml.
- 10 matraces Erlenmeyer de 100ml.
- 10 matraces Erlenmeyer de 500ml.
- 5 matraces Erlenmeyer de 1 litro.
- 10 tubos Falco de 50ml
- 5 tubos Falco de 15ml
- Pipeta de 25ml
- 4 recipientes pasticos de 20 litros.
- Pipetas Pasteur
- Micro pipetas de 2 a 1000 μL
- Cámara de Neubauer
- 20 porta y cubreobjetos
- 10 cajas Petri de plástico
- 5 cajas Petri de vidrio
- 15 peceras de vidrio 20 litros de capacidad.
- Sifoneador
- Guantes
- Mascarilla
- Gafas de protección

- Overol
- Botas
- Red de 500 micras
- 20 metros de manguera para aireación.
- 4 filtros para acuario.
- 15 piedras difusoras.
- 6 metros de tubo pvc
- Accesorios pvc
- Teflón
- 15 Llaves reguladoras de aire
- 15 Tanques plásticos de 50 L
- 5 Tanques plásticos de 100 L
- Tanque plástico de 550 L
- 5 metros de sarán
- 10 metros de piola
- 30 Frascos de 10 cc
- 60 Jeringuillas de 3cc
- Formol
- Vasos de precipitación de 50 mL
- Vasos de precipitación de 10 mL
- Probetas de 50 mL
- Probetas de 25 mL

- Pipetas graduadas
- Frascos ambar
- Pera de absorción
- Pinzas
- Hoja rasuradora
- Bisturís
- Papel filtro
- Papel aluminio
- Parafilm
- Moldes de polipropileno
- Frasco de rejillas de cobre
- Barras de vidrio
- Stubs
- Malla de cobre (mesh)
- Placas adhesivas de carbono

3.2.2 Equipos

- Microscopio óptico
- Centrífuga
- Micro centrífuga
- Incubadora de laboratorio
- Oxímetro
- pH-metro

- 2 lámparas fluorescentes.
- Balanza analítica.
- 20 calentadores para acuario.
- 8 motores doble salida para acuario
- Molino para carne
- Molino para harina
- Termómetro láser.
- Motor de aireación
- 4 filtros aireadores de pecera
- Espectrofotómetro UV
- Micrótopo
- Autoclave
- Cámara de flujo
- Estereomicroscopio
- Refrigeradora
- Cortadora de cuchillas de vidrio
- Ultramicrótopo
- Rotador automático
- Microscopio electrónico
- Metalizador (Sputter coater)

3.2.3 Reactivos

- Fertilizante foliar Nitrofoska.

- Carbendazim
- Formalina 10%
- Dimetilsulfóxido (DMSO)
- Hexametildisilano(HMDS)
- Cloro
- Azul de metileno
- Alcohol antiséptico.
- Kits hematológicos
- Agar
- Eugenol
- 10 g de gelatina sin sabor
- 2 kg de alimento de crecimiento 1 para tilapia
- 0,5 kg de alimento inicial de tilapia
- Resina Epoxy
- Glutaraldehído
- Etanol
- Fosfato de Sorensona
- Tetraóxido de Osmio
- Óxido de propileno
- Acetato de uranilo
- Citrato de plomo
- Hidróxido de potasio

3.2.4 Organismos

- Cepa de la microalga endémica *Chlorella sp.* biotipo 1
- 200 alevines de tilapia roja *Oreochromis sp.*
- 100 juveniles de tilapia roja *Oreochromis sp.*
- Frasco de huevos de *Artemia salina*.

3.3 Métodos

La concentración letal media de carbendazim para tilapia se obtuvo de un ensayo de toxicidad aguda con alevines de la especie. Para la evaluación de toxicidad crónica se usaron juveniles de tilapia a los cuales se les administró un complemento de microalga en pellets y dosis sub-letales de carbendazim.

Esta metodología evaluó los efectos a nivel hematológico e histológico sobre peces juveniles de tilapia y llevado a cabo bajo condiciones de laboratorio.

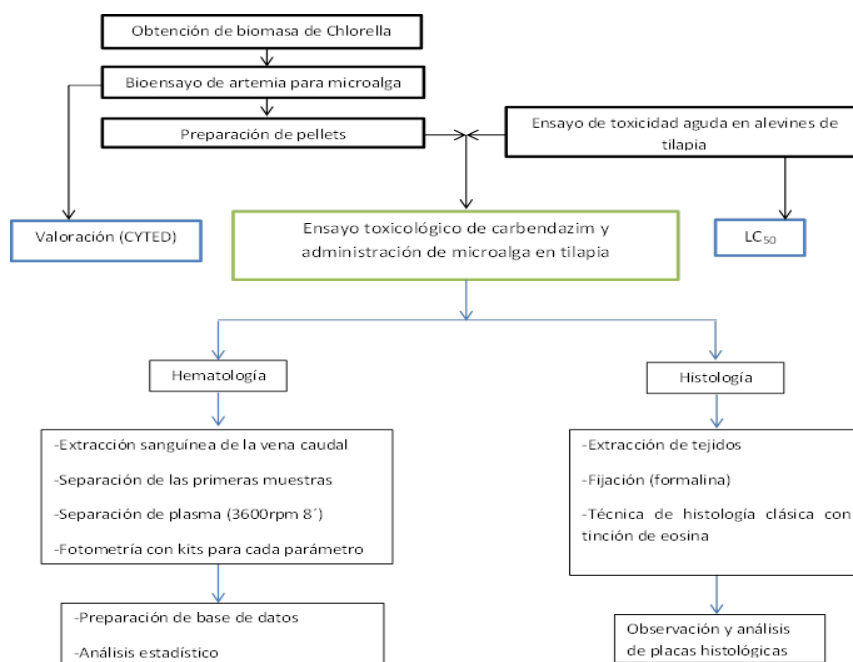


Figura 5 Esquema metodológico usado en el proyecto

3.3.1 Aislamiento y masificación de *Chlorella sp.*

Se trabajó con una cepa pura de *Chlorella sp.* biotipo 1 del cepario del Laboratorio de Acuicultura y Recursos Bioacuáticos de las Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE, colectada en el sistema lacustre de Papallacta a una altitud de 3748 msnm, latitud 17M,818079, longitud 9964895.

Para iniciar con el proceso de escalamiento, en cámara de siembra se tomó con un asa de platino muestras de la cepa de *Chlorella sp.*, mantenida en refrigeración en cajas Petri en el cepario y se colocan en tubos de ensayo con dos mililitros de medio Nitrofoska. Los tubos fueron expuestos a iluminación artificial durante 3 días (Ortiz, Ávalos, & Rueda, 2015).

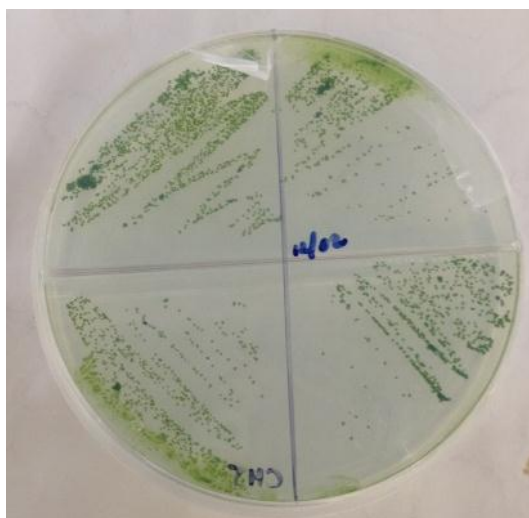


Figura 6 *Chlorella sp.* Biotipo 1

Transcurrido este tiempo, se renovó el medio, con 3 mililitros (mL) del medio Nitrofoska de composición: nitrógeno (N) 30%; fósforo (P_2O_5) 10%; Potasio (K_2O); Magnesio (MgO) 0.6%, tres días después se volvió a colocar 5 mL de medio para seguir fomentando el crecimiento de las cepas (escalamiento). Cuando se completaron 10 mL, se escaló el cultivo a 100 mL en matraces Erlenmeyer y 1 semana después cuando se registró el apareamiento de una tonalidad verde más intensa, se escaló a 800 ml en matraces Erlenmeyer y se instaló el sistema de aireación, tres días

después se coloca 200 mL medio Nitrofoska para llegar a 1 litro. Después de una semana se escaló a 5 litros en recipientes plásticos, transcurridos otros 7 días se escala a 20 litros (Gapasin, 1998).



Figura 7 Cultivo de *Chlorella* sp., en diferentes fases de escalamiento

El medio de cultivo se adicionó periódicamente (como ha sido indicado) para enriquecer con nutrientes a las cepa y lograr masificarla. Se mantuvo a temperatura ambiente, con irradiación ($238 \mu\text{mol quanta/m}^2\text{s}$) y aireación permanente (Camacho, 2009).

Durante el proceso de escalamiento, se registró el conteo celular en cámara de Neubauer: DC
 inóculo = $N \times (10)^4 \times \text{FD}$

En donde:

DC inóculo: Densidad celular del inóculo (células/mL)

N: Promedio de células presentes. De acuerdo al número de cuadrantes contados en la cámara de Neubauer.

$(10)^4$: Factor de conversión de 0.1 μL a 1 mL.

FD: Factor de dilución $\text{FD} = \text{Vol inicial} + \frac{\text{Vol final}}{\text{Vol inicial}}$

Una vez que se comprobó mediante conteo celular que el cultivo de 20 litros de *Chlorella* sp., alcanzó la fase estacionaria con una densidad de 15 millones de células por mililitro, se

centrifugó para concentrar la biomasa, fue secada en estufa a 30 °C y almacenada a -4°C para conservar sus propiedades (Pino & Lazo, 2010).

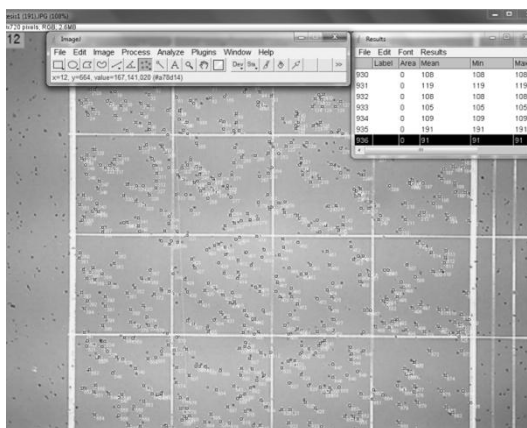


Figura 8 Conteo celular de microalga



Figura 9 Biomasa de microalga

3.3.2 Evaluación toxicológica de *Chlorella sp.*

La investigación propone la evaluación toxicológica de la microalga *Chlorella sp.* Para este propósito, se utilizó el bioensayo de letalidad en *Artemia salina*, para lo cual se colocó 1 miligramo (mg) de huevos de *Artemia salina* en un recipiente incubador con 1000 ml de solución salina a 25 partes por mil (ppt), se instaló una bomba de oxígeno con burbujeo lento, iluminación artificial y un calentador a 25°C. Transcurridas 48 horas, se transfirió los nauplios eclosionados a un recipiente con solución salina. La biomasa de 60 mg de *Chlorella sp.*, se disolvió en 15 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) y en 6 ml de agua destilada. A partir de esta solución de 10000 partes por millón (ppm) se preparó diluciones de 0, 1, 10, 100, 250, 500, 1000, 1500, 2000, 3000 ppm, y controles de DMSO, en 3 repeticiones. En dos mililitros de solución salina a 25 ppt se colocó 10 nauplios de artemia y transcurridas 24 horas se analiza la mortalidad (Sánchez & Neira, 2005).



Figura 10 Observación bioensayo de *Artemia*

3.3.3 Elaboración del complemento de microalga

Se elaboró un complemento adicionando microalga al balanceado comercial de engorde para tilapia con 32% de proteína, 5% de grasa cruda, 5% de fibra cruda, 8% de cenizas, 11% humedad; con una relación de 300 mg de *Chlorella sp.*, por kilogramo de biomasa de tilapia en referencia a otros estudios ya realizados (Mohd *et al.*, 2009). Siendo triturado el alimento para etapa juvenil por medio de un molino convencional y posteriormente peletizado con la complementación de biomasa microalgal (Camacho, 2009).



Figura 11 Materiales del complemento de microalga y pellets

3.3.4 Ensayo de toxicidad aguda en tilapia

En el ensayo se utilizaron ciento veinte peces, estuvieron en condiciones homogéneas de temperatura, pH y saturación de oxígeno (Nicovita, 2007). Los alevines de tilapia, se transportaron del centro piscícola del Consejo Provincial de Pichincha ubicado en el sector de Nanegal. Después de la aclimatación durante 15 días en laboratorio, los peces se colocaron en cuatro lotes experimentales, 24 horas previas al ensayo. Para determinar la concentración letal (LC_{50}), se preparó una solución stock de 15000 ppm carbendazim (BCM, Methyl benzimidazol-2-ylcarbamate, 97%, Aldrich Chem. Co. Inc., USA) en agua destilada, y mediante diluciones se colocó repeticiones por triplicado de las siguientes concentraciones; 0, 2, 4 y 8 ppm, en peceras

de vidrio con medidas (30 x 30 x 30 cm), con un volumen de agua filtrada de 10 litros y fueron agregados 10 alevines de tilapia híbrida. El período de exposición del experimento fue de 5 días sin cambio de agua, ni alimentación, registrando la mortalidad cada día. Los datos se analizaron por una regresión probit (SPSS Inc.). Este ensayo se procedió de acuerdo con métodos estandarizados (ASTM , 1980).



Figura 12 Aplicación de carbendazim

3.4 Diseño experimental

3.4.1 Factores

Los factores a probar en la presente investigación fueron, (1) dieta (inclusión de *Chlorella* sp. dieta balanceada) y (2) concentraciones sub-letales de carbendazim.

3.4.2 Tratamientos

Tabla 4

Características de los tratamientos aplicados en la investigación

Tratamiento	Características	Detalle
T1	Al tratamiento control se administró el 3% del peso vivo por unidad experimental de alimento comercial de crecimiento 1 para tilapia Sin carbendazim ni microalga.	Sin complemento de <i>Chlorella sp.</i> y 0 ppm de carbendazim
T2	Se aplica en el agua la concentración baja subletal de carbendazim, más la administración de <i>Chlorella sp.</i> , en la dieta balanceada.	0.5 ppm carbendazim + 300 ppm <i>Chlorella sp.</i>
T3	Se aplica en el agua la concentración alta subletal de carbendazim, más la administración de <i>Chlorella sp.</i> en la dieta balanceada	0.75 ppm carbendazim + 300 ppm <i>Chlorella sp.</i>
T4	La concentración subletal baja de carbendazim se aplica en el agua.	0.5 ppm carbendazim
T5	La concentración subletal alta de carbendazim se aplica en el agua	0.75 ppm carbendazim

Las concentraciones sub-letales alta y baja del fungicida carbendazim correspondientes a los tratamientos T2, T4, T3 y T5 se calcularon en base al del ensayo de toxicidad aguda y la dosis letal media (ASTM , 1980).

Los pellets con inclusión de *Chlorella sp.*, se elaboraron en base al nivel de toxicidad obtenido en el bioensayo de *Artemia salina*, determinando la administración de 300 miligramos de biomasa de microalga al día por kilogramo en función del peso vivo de la unidad experimental, como se presenta en otros estudios realizados por (Mohd *et al.*, 2009).

3.4.3 Tipo de Diseño

Se empleó un diseño completamente al azar bifactorial 2x2+1, debido a que el ensayo se manejó bajo condiciones controladas de laboratorio.

3.4.4 Repeticiones

Se consideró 3 repeticiones por cada tratamiento para el diseño experimental del presente estudio.

3.4.5 Unidades experimentales

Se procedió en el ensayo con un total de noventa unidades observacionales y quince unidades experimentales las cuales fueron tanques plásticos cilíndricos, con cuarenta litros de agua. Cada tanque contó con seis juveniles de tilapia de nueve a doce centímetros de longitud total.

3.4.6 Croquis experimental

A continuación se presenta el croquis experimental del diseño completamente al azar bifactorial que se utilizó en el presente proyecto de investigación. Las quince unidades experimentales fueron colocadas aleatoriamente.

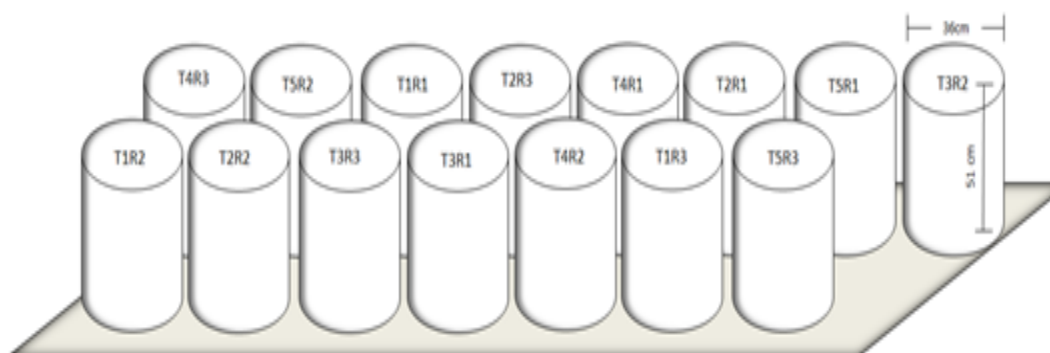


Figura 13 Croquis experimental

3.5 Ensayo de toxicidad crónica

Se obtuvo noventa juveniles de tilapia, los mismos que fueron adquiridos del centro piscícola del Consejo Provincial de Pichincha ubicado en Nanegal. La adaptación y mantenimiento de los mismos se realizó en cuatro tanques plásticos de cien litros de agua con

calentadores, aireación y sistema de filtrado, se alimentó dos veces al día a base del tres por ciento del peso vivo. Posteriormente se distribuyó a los peces en cinco tratamientos por triplicado en las quince unidades experimentales descritas (Buenaño, 2010). Encada tanque se incorporó un sistema de aireación y calentamiento además se limpió las impurezas de manera diaria. El cambio de agua junto con la renovación del fungicida carbendazim se realizó cada tres días junto con el control de parámetros de temperatura, pH y oxígeno disuelto. El ensayo tuvo una duración de veinte y un días (Pino & Lazo, 2010).



Figura 14 Ejemplar juvenil de tilapia híbrida



Figura 15 Área experimental del ensayo

3.6 Variables a evaluar

3.6.1 Variables hematológicas

Al finalizar el ensayo de toxicidad crónica se anestesió los peces y se procedió con la extracción de sangre de la vena caudal con una jeringuilla previamente heparinizada, se obtuvo la muestra de sangre total para los análisis de hemoglobina y hematocrito y luego se procedió a centrifugar a 3600 revoluciones por minuto por 10 minutos para lograr la separación del plasma.



Figura 16 Extracción sanguínea de la vena caudal

Se tomaron ocho muestras de sangre por tratamiento para realizar los análisis hematológicos, para hematocrito se colocó la sangre en capilares se centrifugó y mediante una tabla de micro-hematocitómetro se realizó la lectura de las muestras. Las variables de glucosa, albúmina, proteína total, hemoglobina, creatinina y las variables enzimáticas plasmáticas como aspartato aminotransferasa (AST), alanina transaminasa (ALT), colinesterasa y fosfatasa alcalina se usaron métodos fotométricos colorimétricos (Kits HUMAN y Weiner) y se midieron con el uso del espectrofotómetro UV (Min & Kang, 2008).



Figura 17 Proceso de análisis fotométrico sanguíneo



Figura 18 Muestras sanguíneas preparadas para espectofotometría

Tabla 5

Características metodológicas de las variables hematológicas

Variable	Unidades	Tipo de muestra	Cantidad	Metodología
Glucosa	mg/dl	Plasma	10 μ l	Fotometría
Albumina	g/dl	Plasma	10 μ l	Fotometría
Proteína total	g/dl	Plasma	20 μ l	Fotometría
Hemoglobina	g/dl	Sangre	25 μ l	Fotometría
Hematocrito	%	Sangre		
Creatinina	mg/dl	Plasma	50 μ l	Fotometría
Colinesterasa	U/l	Plasma	5 μ l	Fotometría
(AST)	U/l	Plasma	50 μ l	Fotometría
(ALT)	U/l	Plasma	50 μ l	Fotometría
Fosfatasa alcalina	U/l	Plasma	10 μ l	Fotometría

Fuente: (Min & Kang, 2008)

3.6.2 Análisis estadístico

Se tomó en cuenta para el análisis ocho muestras de sangre de juveniles de tilapia, para cada variable hematológica por tratamiento. Por tratarse de un diseño completamente al azar, con cinco tratamientos y tres repeticiones, el esquema que se aplicó fue el siguiente:

Tabla 6

Análisis de varianza para un DCA bifactorial, con cinco tratamientos y tres repeticiones

Fuente de variación	Grados de libertad	
FACTOR A	(a-1)	1
FACTOR B	(b-1)	2
Interacción AB	(a-1)(b-1)	2
Error	glt-gla-glb-glab	9
Total	glt=n.-1	14

El modelo matemático para la variable de respuesta, que permitió descomponer la variación total de las observaciones en la variación entre tratamientos y la variación entre unidades experimentales que recibieron el mismo tratamiento, fue el siguiente:

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + B_j + AB_{ij} + e_{ijk}$$

Donde:

μ = media poblacional

A_i = efecto del i-ésimo del factor complemento de microalga

B_j = efecto del j-ésimo del factor dosis de carbendazim

AB_{ij} = efecto del i-ésimo del factor complemento de microalga y las dosis de carbendazim

e_{ijk} = error experimental

El análisis estadístico se realizó con el software statgraphics, Los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas se verificaron de forma analítica, mediante sesgo estandarizado y/o curtosis estandarizada (de -2 a +2), se concluyó que siguen una distribución normal y si el p-valor resultante de la prueba de Levene fue inferior al nivel de significación $\alpha = 0.05$, se concluye que existe una diferencia entre las variaciones en la población.

Para las variables de colinesterasa y fosfatasa alcalina con el fin de eliminar dependencia de las desviaciones con la media se procedió a la transformación de los datos a logaritmo base diez.

Cumpliendo los datos con estos supuestos, se realizó el análisis de varianza para la determinación de medias de tratamientos significativamente diferentes, y análisis de comparaciones múltiples de Fisher.

3.6.3 Variables histológicas

Al final de los veinte y un días de ensayo, se preparó placas histológicas de tejido branquial y hepático. Se sacrificó a los peces en una solución de eugenol. Los tejidos fueron removidos y directamente fijados en buffer al 10% de formalina neutral, procesados para seccionamiento micrótopo a 5 μ m y luego teñidos con hematoxilina, eosina. Se preparó 2 placas histológicas por tratamiento y órgano, las cuales se fotografiaron mediante un microscopio óptico, posteriormente se evaluó los daños en forma categórica de la condición que se observaron en los tejidos (Figueiredo & Rocha, 2006).



Figura 19 Placa histológica de tejido branquial de tilapia

3.6.4 Microscopía electrónica

Las muestras se obtuvieron en el laboratorio de acuicultura y recursos bioacuáticos – IASA I, se extrajo el hígado y branquias de los peces y se conservaron de manera directa en glutaraldehído al tres por ciento en refrigeración. El proceso de preparación y observación de las muestras se realizó en el laboratorio de microscopía electrónica ESPE.

3.6.4.1 Preparación de muestras microscopía de trasmisión

Se cortó el tejido hepático en trozos de aproximado dos milímetros cúbicos manteniendo un ambiente aséptico. La preparación química inició con la fijación de las muestras a 4°C de temperatura durante dos horas en Glutaraldehído al 4% 0.1 molar de buffer fosfato de Sorensón a pH 7.2. Procediendo con tres lavados usando el mismo buffer a 4°C durante 15 minutos cada uno. La post-fijación se realizó a 4°C durante una hora en inmersión de las muestras en tetraóxido de osmio (TOO) al 1% con el buffer usado anteriormente, se continuó el protocolo con tres lavados de dos minutos en agua destilada. Posteriormente se realizó la deshidratación de las muestras a 4°C de temperatura durante 30 minutos cada porcentaje, en un seriado de etanol al: 30%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 99%, 99%, continuando se colocó las muestras a la misma temperatura en una solución de etanol a 99% hasta el siguiente día. Se procesan las muestras a una temperatura de 4°C, dos veces durante 5 minutos en óxido de propileno (PO) (Gapasin, 1998).

3.6.4.2 Elaboración de resinas

Se empleó en este protocolo resina media (Hamasaki & Sekiya, 1998). Utilizando 20 mL de Epon 812, 16 mL de DDSA, 8 mL de MNA y 1.3 mL de BDMA. Se procedió a colocar el material de vidrio a 60 °C durante 20 minutos reduciendo así la viscosidad de las sustancias. Continuando con el protocolo se colocó cada uno de los polímeros en orden, comenzando con Epon 812, DDSA y MNA, se removió la mezcla durante 10 minutos y finalmente se añadió el

BDMA para volver a mezclarlo durante 10 minutos. La infiltración de la muestra en la resina, se mezcló 50% de epoxy y 50% de óxido de propileno, para la posterior incubación a temperatura ambiente durante 60 minutos en agitación, luego se retiró toda la mezcla de resina y se la reemplazó con mezcla 75% epoxy y 25% de óxido de propileno, se incubó a temperatura ambiente por una hora con agitación, después se removió la resina y se lo reemplazó con 100% de epoxy incubándolo a temperatura ambiente por 1 hora en agitación, se volvió a remover la resina y se lo reemplazó con 100% de epoxy con los mismos parámetros anteriormente descritos, posteriormente para la polimerización según Urcos (2009), se colocaron las muestras en epoxy fresco al 100% y se lo incubó a 60°C, durante 2 días.



Figura 20 Mezcla de resinas en muestras de tejido hepático de tilapia

3.6.4.3 Tallado de resina

Se usó un estéreo-microscopio con un soporte para la resina que fue manipulada con una hoja rasuradora hasta obtener una pirámide truncada con forma trapezoidal en la punta,

verificando que la muestra se encuentre en el centro y procurando que la superficie de la cara frontal de la resina quede lisa, con sus bases trapezoidales paralelas.

3.6.4.4 Seccionamiento

Mediante una cortadora RMC de barras de vidrio se realizó las cuchillas triangulares con gran precisión siguiendo las recomendaciones y normas de la metodología propia del equipo. Los cortes ultra finos fueron obtenidos por medio del ultramicrotomo marca RMC, se alineó la cuchilla de vidrio a la resina colocada en el soporte de muestra del instrumento, se calibró y llenó con agua el soporte de la cuchilla, se procedió los cortes con una velocidad programada de 1 mm/s y 100 nanómetros de espesor. Se verificó cuando la tira tiene una coloración dorada, seguido a ello se reemplazó la cuchilla de vidrio por una cuchilla de diamante. Una vez obtenida la cinta se la recogió cuidadosamente sobre una rejilla de cobre (mesh) previamente calentada y cubierta con una capa de oro.

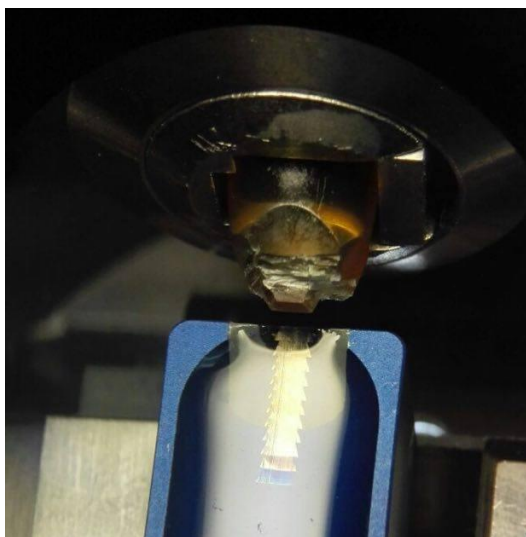


Figura 21 Corte de tejido hepático a 100 nm en ultramicrotomo

3.6.4.5 Tinción

Según el protocolo descrito por Eric (2012) modificado, se utilizó acetato de uranilo al 2% con pH entre 3.5 y 4, ésta solución siempre debe ser filtrada previo a su utilización así como mantenida bajo 4°C protegida de la luz. Por otra parte para la preparación del citrato de plomo se utilizaron reactivos de nitrato de plomo y citrato de sodio en cantidades dependientes al volumen necesario. En una caja petri se colocó como base un pedazo de parafilm con varias gotas del reactivo, sobre las cuales se colocaron las rejillas con la muestra en contacto con el reactivo, se dejó reposar a temperatura ambiente durante 5 minutos protegido de la luz. Mientras las muestras eran teñidas se preparó una caja petri para la tinción con citrato de plomo colocando un pedazo de parafilm en su interior y a su alrededor pellets de hidróxido de sodio o hidróxido de potasio, para que absorban el dióxido de carbono. Sobre el parafilm se colocaron varias gotas del reactivo, desechando las 3 primeras gotas sobre los pellets. Una vez transcurrido el tiempo de tinción con acetato de uranilo se realizaron cuatro lavados en agua destilada hervida, sumergiendo el mesh de 6 a 8 veces en cada lavado. Seguido a ello se colocaron las rejillas boca abajo sobre las gotas de citrato de plomo durante 3 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se retiró la rejilla y se realizó el mismo lavado descrito anteriormente, una vez finalizado el lavado se colocó la rejilla sobre papel filtro para eliminar el exceso de agua en el mesh durante 10 minutos.

3.6.4.6 Preparación de muestras microscopía de barrido MEB o SEM

Se tomó en cuenta el protocolo descrito por Mogana y Ramasami (2006) para tejidos que pueden ser tomados con pinzas, se cortó filamentos de las branquias con bisturí y pinzas para evitar cualquier contaminación al momento de su observación. La fijación de las muestras a 4°C de temperatura durante dos horas en glutaraldehído al 5% 0.1 molar de buffer fosfato de

soresona pH 7.2. Posteriormente se realizó el lavado usando el mismo buffer en el paso anterior durante tres veces con una duración de 10 minutos por cada lavado. La post-fijación se la realizó con tetraóxido de osmio al 1% en temperatura ambiente durante una hora, se continuó con el protocolo mediante dos lavados de diez minutos cada uno en agua destilada. La deshidratación fue realizada con una serie de diluciones de etanol: las muestras fueron inmersas durante 15 minutos en las siguientes concentraciones: 35%, 50% y 75%, luego durante dos intervalos de 15 minutos se colocaron las muestras a 95%, y durante tres ocasiones durante 20 minutos fueron colocaron las muestras en etanol absoluto.



Figura 22 Manipulación de Hexametildisilano (HDMS) en preparación de muestras para microscopía electrónica

Se traslada las muestras a hexametildisilano (HDMS) durante dos ciclos de 10 minutos, teniendo en cuenta que es un reactivo inflamable, tóxico y al momento de su uso es necesario nitrógeno gaseoso el cual se administró con un globo como se muestra en la figura 22, posteriormente se tapa las muestras con parafilm y se coloca en un secador de sílice durante toda la noche. El montaje de los filamentos fue realizado en stubs con cinas doble cara adhesiva de carbono. Usando un melatizador o sputter coater se procedió a recubrir las muestras con oro.



Figura 23 Montajes de branquias en stubs

Una vez preparadas las muestras de tejido hepático y branquial se procedió a la observación.

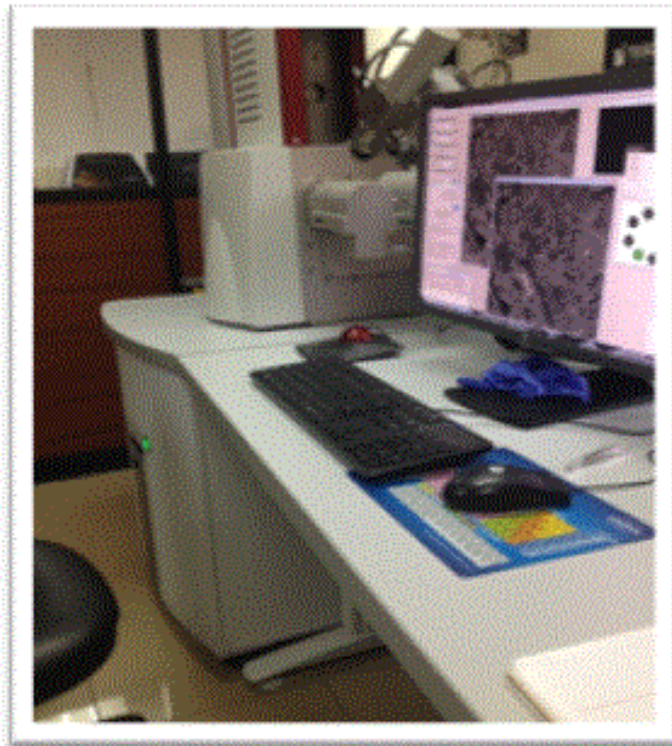


Figura 24 Observación de tejido hepático en microscopio electrónico

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Pruebas de toxicidad de *Chlorella sp.* en *Artemia salina*

En la tabla 7 se muestra el nivel de toxicidad de *Chlorella sp.* biotipo 1 en *Artemia salina*. Al utilizar las siguientes concentraciones en ppm, la microalga *Chlorella sp.* biotipo 1 no ejerció efecto tóxico sobre los nauplios de artemia y se estableció que la concentración letal media es mayor a 1500 µg/ml según la comunidad científica CYTED (Eric, 2012).

Tabla 7

Clasificación de toxicidad CYTED

Clasificación toxicidad según CYTED			
Categoría	Nivel de toxicidad	CL50	
I	Extremadamente tóxico	1 - 10	µg/ml
II	Altamente tóxico	10 - 100	µg/ml
III	Moderadamente tóxico	100 -500	µg/ml
IV	Ligeramente tóxico	500 – 1000	µg/ml
V	Prácticamente no tóxico	1000 - 1500	µg/ml
VI	Relativamente inocuo	> 1500	µg/ml

Fuente: (Eric, 2012)

Villafuerte (2016), afirma que el biotipo *Chlorella sp.*, del alto andino ecuatoriano no debe ser suministrado para dietas para peces a una dosis mayor de 100 ppm, por la presencia de compuestos inhibidores fenólicos y concentraciones de elementos traza que pueden conferir un grado de toxicidad importante.

Mihae (2016) obtuvo resultados similares a los obtenidos en la presente investigación ya que se determinó que *Chlorella sp.*, biotipo 1, contiene niveles importantes de compuestos fenólicos y baja toxicidad.

4.2 Establecimiento de la concentración letal media de carbendazim CL₅₀ en el ensayo de toxicidad aguda en alevines de tilapia

Una vez efectuados los ensayos de toxicidad aguda, se determinó que la concentración letal media de carbendazim es 7.5 ppm, dosis que provocó mortalidad en el 50% de tilapias.

Al analizar los resultados con el software estadístico SPSS versión 2001, Obteniendo el análisis Probit y los límites de confianza al 95 % como se muestra en la tabla 8, SE estableció que la concentración letal media obtenida por la regresión es de 7.5 partes por millón, con límites de confianza al 95% superior e inferior respectivamente de (6.3 y 10.4) que afecta en mortalidad a la mitad de la población de alevines de tilapia

Tabla 8

Análisis probit (CL₅₀); Límites de confianza para concentración de carbendazim (ppm) expuesto en tilapia híbrida (Oreochromis sp.)

Probit	Concentración (ppm)	Límite de confianza al 95%	
		Inferior	Superior
0.01	2.203	0.910	3.118
0.02	2.545	1.183	3.461
0.03	2.789	1.396	3.702
0.04	2.987	1.581	3.896
0.05	3.160	1.748	4.065
0.06	3.314	1.903	4.215
0.07	3.455	2.049	4.354
0.08	3.587	2.188	4.484
0.09	3.711	2.322	4.608
0.1	3.829	2.452	4.726
0.15	4.360	3.055	5.277
0.2	4.833	3.608	5.811
0.25	5.280	4.122	6.370
0.3	5.716	4.602	6.984
0.35	6.153	5.050	7.676
0.4	6.598	5.471	8.465
0.45	7.059	5.872	9.367

CONTINÚA 

0.5	7.544*	6.262	10.404
0.55	8.063	6.651	11.602
0.6	8.627	7.049	13.003
0.65	9.251	7.466	14.665
0.7	9.957	7.916	16.682
0.75	10.780	8.417	19.205
0.8	11.777	8.999	22.501
0.85	13.056	9.712	27.104
0.9	14.864	10.674	34.315
0.91	15.337	10.917	36.334
0.92	15.868	11.188	38.665
0.93	16.473	11.492	41.406
0.94	17.176	11.840	44.701
0.95	18.015	12.249	48.785
0.96	19.052	12.745	54.070
0.97	20.410	13.381	61.368
0.98	22.366	14.272	72.635
0.99	25.837	15.791	94.782

*Concentración letal media

En la figura 25 se muestra la mortalidad y sus intervalos de confianza (superior e inferior al 95%) en alevines de tilapia de acuerdo a la concentración (ppm) de carbendazim.

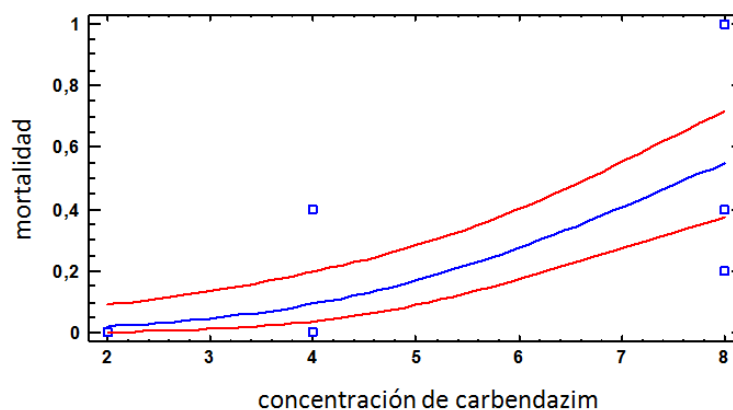


Figura 25 Modelo ajustado Probit de letalidad media en tilapia híbrida (n = 120) ($p \leq 0.05$)

La agencia de protección ambiental EPA en el año 2016 realizó estudios de toxicidad aguda de carbendacim en varias especies acuícolas, entre ellas carpa (*Pimephales promelas*) de 0.7

gramos de peso, mostró una letalidad media de 10 ppm, siendo un valor cercano a los 7.5 ppm encontrados en este estudio.

4.3 Efecto terapéutico de la biomasa de *Chlorella sp.*, sobre la exposición de carbendazim en juveniles de tilapia híbrida

4.3.1 Hemoglobina

Finalizado el ensayo de administración de microalga y exposición de carbendazim en juveniles de tilapia híbrida, se procedió a la extracción sanguínea. Los datos fueron verificados para normalidad (sesgo curtosis -2 a +2) y homocedasticidad ($p = 0.89$).

Tabla 9

Pruebas de múltiples rangos LSD Fisher para hemoglobina

Tratamiento		Hemoglobina (g/dL)	Grupos Homogéneos
T5: 0.75 (ppm) CBM		6.57	X
T3: 0.75 (ppm) CBM + <i>Chlorella sp.</i>		7.34	XX
T4: 0.5 (ppm) CBM		7.73	XX
T2: 0.5 (ppm) CBM + <i>Chlorella sp.</i>		8.92	XX
T1: Control		10.40	X
Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
T1 - T2		1.49	3.31
T1 - T3		3.06	3.31
T1 - T4		2.68	3.31
T1 - T5	*	3.84	3.31
T2 - T3		1.57	3.31
T2 - T4		1.19	3.31
T2 - T5		2.35	3.31
T3 - T4		-0.38	3.31
T3 - T5		0.78	3.31
T4 - T5		1.16	3.31

La tabla 9 muestra las diferencias y comparaciones entre medias de los tratamientos en la prueba de múltiples rangos, los resultados entre el tratamiento cinco (0.75 ppm Carbendazim) y el tratamiento uno (Control) muestran una diferencia significativa $p \leq 0.05$ por la prueba LSD Fisher con una disminución de hemoglobina de 3.84 g/dl en relación al tratamiento control.

En la figura 26 se aprecia el nivel de hemoglobina posterior al ensayo de administración de microalga y exposición de carbendazim en tilapia.

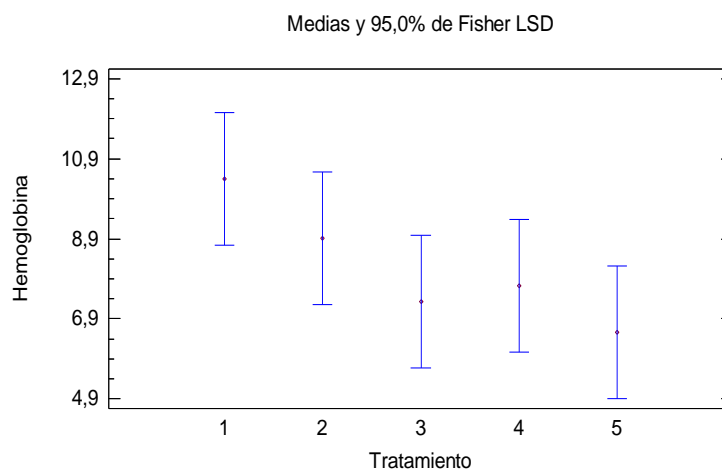


Figura 26 Nivel de hemoglobina g/dL por tratamiento

La figura 26 muestra que los tratamientos con presencia de microalga presentan niveles de hemoglobina (Hb) de 8.92 y 7.34 cercanos al tratamiento control 10.40 g/dL, similar al 10.52 g/dL reportado por Rodriguez *et al.*, (2006). Se evidencia una disminución inversamente proporcional a la concentración de carbendazim, en los tratamientos a mayor concentración del fungicida, muestran menores niveles de hemoglobina. Estos resultados se corroboran con lo reportado por Ramesh y Saravanan (2010) en estudios realizados en peces expuestos a insecticidas, organofosforados. Los autores argumentan que dicho cambio puede deberse a la

rápida oxidación de la Hb a metahemoglobina, o a la liberación de radicales del oxígeno provocada por el estrés tóxico.

4.3.2 Hematocrito

Finalizado el ensayo de administración de microalga y exposición de carbendazim en juveniles de tilapia híbrida, se procedió a la extracción sanguínea. Los datos fueron verificados para normalidad (sesgo curtosis -2 a +2) y homocedasticidad ($p = 0.62$).

Tabla 10

Pruebas de múltiples rangos LSD Fisher para hematocrito

Tratamiento	Hematocrito (%)	Grupos Homogéneos
T3: 0.75 (ppm) CBM + <i>Chlorella sp.</i>	22.67	X
T5: 0.75 (ppm) CBM	23.22	X
T4: 0.5 (ppm) CBM	24.05	X
T2: 0.5 (ppm) CBM + <i>Chlorella sp.</i>	26.57	X
T1: Control	32.94	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
T1 - T2		6.37	11.89
T1 - T3		10.28	11.89
T1 - T4		8.89	11.89
T1 - T5		9.72	11.89
T2 - T3		3.91	11.89
T2 - T4		2.52	11.89
T2 - T5		3.35	11.89
T3 - T4		-1.39	11.89
T3 - T5		-0.55	11.89
T4 - T5		0.83	11.89

* indica una diferencia significativa.

La tabla 10 muestra las diferencias y comparaciones entre medias de los tratamientos en la prueba de múltiples rangos, los resultados entre tratamientos no muestran diferencia significativa al 95% por la prueba LSD Fisher.

En la figura 27 se aprecia el porcentaje de hematocrito posterior al ensayo de administración de microalga y exposición de carbendazim en tilapia.

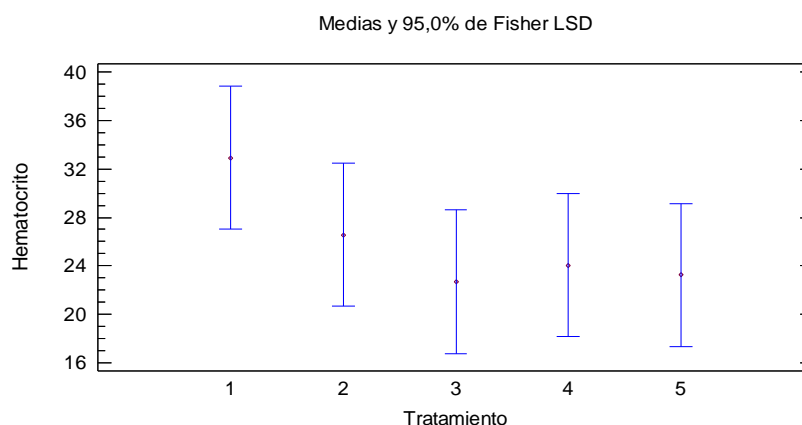


Figura 27 Porcentaje de hematocrito por tratamiento

Los resultados obtenidos en la figura 27 muestran que las medias de los tratamientos experimentales decrecen en comparación al tratamiento control en valores de porcentaje para la variable hematocrito.

El Análisis de hematocrito realizado por Rodríguez *et al* (2012), para tilapia nilótica reportan un valor medio de 31.85% cercano al 32.94% obtenido para el tratamiento control del presente estudio. En *P. lineatus*, Parma *et al* (2000) y Simonato *et al* (2012) reportaron disminución de hematocrito y hemoglobina después de la exposición a cipermetrina y diesel, respectivamente, y concluyeron que los peces presentaban un cuadro de anemia causado por la exposición a dichas sustancias tóxicas. Estos resultados coinciden con los obtenidos en el presente estudio.

4.3.3 Glucosa

Finalizado el ensayo de administración de microalga y exposición de carbendazim en juveniles de tilapia híbrida, se procedió a la extracción sanguínea. Los datos fueron verificados para normalidad (sesgo curtosis -2 a +2) y homocedasticidad ($p = 0.54$).

Tabla 11

Pruebas de múltiples rangos LSD Fisher para glucosa

Tratamiento	Glucosa (mg/dL)	Grupos Homogéneos
T5: 0.75 (ppm) CBM	38.22	X
T4: 0.5 (ppm) CBM	41.61	X
T3: 0.75 (ppm) CBM + <i>Chlorella sp.</i>	41.85	X
T2: 0.5 (ppm) CBM + <i>Chlorella sp.</i>	43.43	X
T1: Control	50.98	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
T1 - T2	7.55	22.83	22.83
T1 - T3	9.13	22.83	22.83
T1 - T4	9.37	22.83	22.83
T1 - T5	12.76	22.83	22.83
T2 - T3	1.58	22.83	22.83
T2 - T4	1.82	22.83	22.83
T2 - T5	5.21	22.83	22.83
T3 - T4	0.24	22.83	22.83
T3 - T5	3.63	22.83	22.83
T4 - T5	3.39	22.83	22.83

La tabla 11 muestra las diferencias y comparaciones entre medias de los tratamientos en la prueba de múltiples rangos, los resultados entre tratamientos no determinan diferencia significativa al 95% por la prueba LSD Fisher.

En la figura 28 se aprecia el nivel de glucosa posterior al ensayo de administración de microalga y exposición de carbendazim en tilapia.

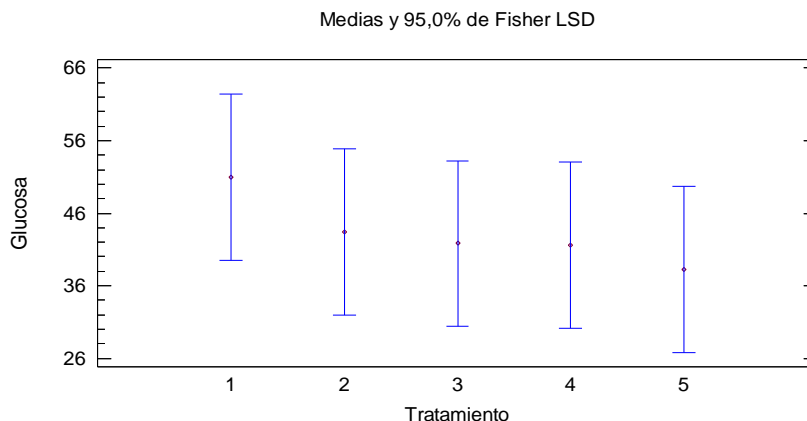


Figura 28 Nivel de glucosa en mg/dL por tratamiento

Los resultados obtenidos en la figura 28 muestran que las medias de los tratamientos experimentales decrecen en comparación a la media (50.98 ± 8.6 mg/dL) del tratamiento 1 o control, en otro estudio de tilapia nilótica bajo sistema semi-intensivo se obtuvo 46 mg/dL de glucosa como referente normal (Pino & Lazo, 2010). Aunque este parámetro está principalmente ligado a la dieta administrada en el organismo en estudio, también es un indicador de estrés, el cual basado en los efectos del cortisol operado generalmente como una hormona hiperglicémica valorada a corto plazo o en toxicidad aguda, mediante la movilización de los aminoácidos lo cual inhibe síntesis y estimula catabolismo proteico plasmático, infiriendo en el proceso de glucogénesis (Kanno & Kazie, 2005). Sin embargo estos mismos autores argumentan que no siempre la elevada presencia de cortisol (estrés) puede generar hiperglicemia, dado que también se han detectado casos de disminución o incluso ningún efecto en los niveles de glucosa plasmática, esto lo atribuyen al aumento en el gasto energético y deficiencia en el proceso de biosíntesis de amilasa.

4.3.4 Colinesterasa

Finalizado el ensayo de administración de microalga y exposición de carbendazim en juveniles de tilapia híbrida, se procedió a la extracción sanguínea. Los datos fueron verificados para normalidad (sesgo curtosis -2 a +2) y homocedasticidad ($p = 0.56$).

Tabla 12

Pruebas de múltiples rangos LSD Fisher para colinesterasa

Tratamiento	Colinesterasa(U/L)	Grupos Homogéneos
T5: 0.75 (ppm) CBM	3.10	X
T2: 0.5 (ppm) CBM + <i>Chlorella sp.</i>	3.17	X
T4: 0.5 (ppm) CBM	3.20	X
T3: 0.75 (ppm) CBM + <i>Chlorella sp.</i>	3.20	X
T1: Control	3.26	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
T1 - T2		0.10	0.23
T1 - T3		0.06	0.23
T1 - T4		0.06	0.23
T1 - T5		0.16	0.23
T2 - T3		-0.04	0.23
T2 - T4		-0.03	0.23
T2 - T5		0.07	0.23
T3 - T4		0.00	0.23
T3 - T5		0.10	0.23
T4 - T5		0.10	0.23

La tabla 12 muestra las diferencias y comparaciones entre medias de los tratamientos en la prueba de múltiples rangos, en los resultados entre tratamientos no se muestra diferencia significativa al 95% por la prueba LSD Fisher.

En la figura 29 se aprecia el nivel de colinesterasa posterior al ensayo de administración de microalga y exposición de carbendazim en tilapia.

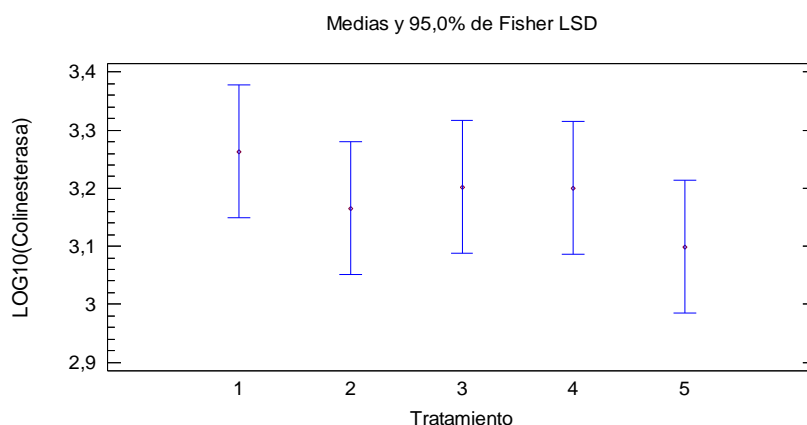


Figura 29 Nivel de colinesterasa sérica U/L por tratamiento

Los resultados obtenidos en la figura 29 muestran que las medias de los tratamientos experimentales, decrecen en comparación al tratamiento control. Sin embargo no se muestran diferencias estadísticas entre tratamientos ni tendencias que demuestren que los factores presenten una acción sobre este parámetro plasmático. Aranzazu (2012) en un estudio realizado con clorpirifos en tilapia reporta que no hubieron manifestaciones de inhibición de colinesterasa, Sin embargo La inhibición de la actividad de la enzima acetilcolinesterasa en el cerebro del pez en exposiciones tóxicas a compuestos organofosforados es muy específica y las concentraciones cercanas a la CL_{50} pueden inducir una disminución del 60% en la actividad fisiológica normal (Díaz, Pérez, & Sánchez, 2009).

4.3.5 Aspartato transaminasa (AST)

Finalizado el ensayo de administración de microalga y exposición de carbendazim en juveniles de tilapia híbrida, se procedió a la extracción sanguínea. Los datos fueron verificados para normalidad (sesgo curtosis -2 a +2) y homocedasticidad ($p = 0.69$).

Tabla 13

Pruebas de múltiples rangos LSD Fisher para aspartato transaminasa (AST)

Tratamiento	AST (U/L)	Grupos Homogéneos
T1: Control	15.25	X
T4: 0.5 (ppm) CBM	19.04	X
T5: 0.75 (ppm) CBM	21.35	X
T2: 0.5 (ppm) CBM + <i>Chlorella sp.</i>	39.19	X
T3: 0.75 (ppm) CBM + <i>Chlorella sp.</i>	40.88	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
T1 - T2		-23.95	42.53
T1 - T3		-25.63	42.53
T1 - T4		-3.79	42.53
T1 - T5		-6.10	42.53
T2 - T3		-1.68	42.53
T2 - T4		20.15	42.53
T2 - T5		17.85	42.53
T3 - T4		21.84	42.53
T3 - T5		19.53	42.53
T4 - T5		-2.31	42.53

La tabla 13 muestra las diferencias y comparaciones entre medias de los tratamientos en la prueba de múltiples rangos, los resultados entre tratamientos no muestran diferencia significativa al 95% por la prueba LSD Fisher.

En la figura 30 se aprecia el nivel de aspartato transaminasa posterior al ensayo de administración de microalga y exposición de carbendazim en tilapia.

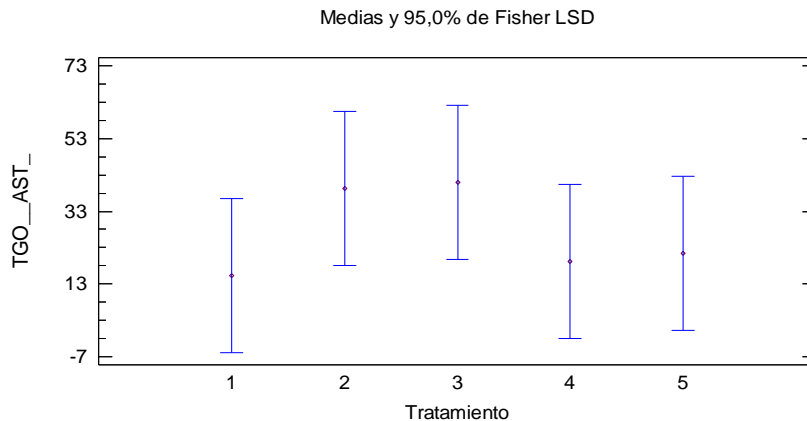


Figura 30 Nivel de aspartato transaminasa U/L por tratamiento

En la figura 30 se muestra el valor de la media del tratamiento 1 o control y el error estándar (15.25 ± 2.85), Según Huberc citado por Mauel *et al* (2009) señala la media normal para tilapia es de 26 U/L con un rango de 16 a 120 U/L.

Se observa un aumento respectivo de 24 y 25 unidades de asparto transaminasa AST por litro, para los tratamientos 2 (0.5 ppm carbendazim + *Chlorella sp.*) y 3 (0.5 ppm carbendazim + *Chlorella sp.*) lo cual muestra una tendencia creciente por la presencia de carbendazim y el efecto agregado de *Chlorella sp.*, para este parámetro enzimático plasmático. Cabe indicar que los niveles de transaminasas pueden incrementarse en relación a las lesiones o alteraciones celulares en hígado, debido a que estas enzimas no han sido muy estudiadas en peces Van der Oost *et al* en el (2002) sugiere la enzima glutatión S-transferasa GSTs como alternativa de biomarcador hepático.

4.3.6 Alanina transaminasa (ALT)

Finalizado el ensayo de administración de microalga y exposición de carbendazim en juveniles de tilapia híbrida, se procedió a la extracción sanguínea y toma de datos. La verificación de los supuestos de normalidad se aprobaron mediante la determinación estandarizada de sesgo y

curtosis (-2 a +2) y prueba de homogeneidad de varianzas Levene ($p=0.89$). El método empleado para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia al 95 % (LSD) de Fisher y la comparación de pruebas de múltiple rangos entre medias de cada tratamiento.

Se procedió a realizar un análisis de varianzas ANOVA en el cual se determina con un valor- p ($p=0.60$) que no existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de los tratamientos para la variable alanina transaminasa ALT, con un nivel del 95,0% de confianza.

Tabla 14

Pruebas de múltiples rangos LSD Fisher para alanina transaminasa (ALT)

Tratamiento				ALT (U/L)	Grupos Homogéneos
T2: 0.5 (ppm) CBM + <i>Chlorella sp.</i>				92.64	X
T3: 0.75 (ppm) CBM + <i>Chlorella sp.</i>				136.37	X
T1: Control				163.96	X
T4: 0.5 (ppm) CBM				192.55	X
T5: 0.75 (ppm) CBM				261.04	X
Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites		
T1 - T2		71.32	237.76		
T1 - T3		27.59	237.76		
T1 - T4		-28.59	237.76		
T1 - T5		-97.08	237.76		
T2 - T3		-43.73	237.76		
T2 - T4		-99.91	237.76		
T2 - T5		-168.40	237.76		
T3 - T4		-56.18	237.76		
T3 - T5		-124.67	237.76		
T4 - T5		-68.49	237.76		

La tabla 14 muestra las diferencias y comparaciones entre medias de los tratamientos en la prueba de múltiples rangos, en los resultados entre tratamientos no se muestra diferencia significativa al 95% por la prueba LSD Fisher.

En la figura 31 se aprecia el nivel de alanina transaminasa posterior al ensayo de administración de microalga y exposición de carbendazim en tilapia.

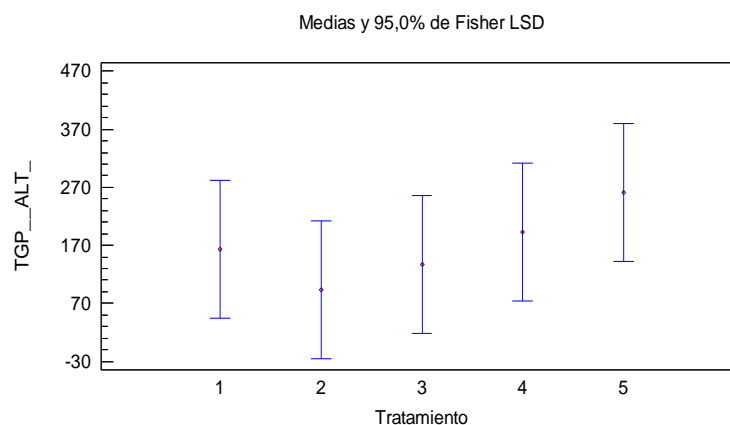


Figura 31 Nivel de alanina transaminasa U/L por tratamiento

En la figura 31 se observa el valor de la media del tratamiento 1 o control y el error estándar (163.9 ± 99.9 U/L), comparando las diferencias numéricas de las medias, se observa que los tratamientos 2 y 3 con administración de microalga disminuyen el nivel de la enzima 28 y 71 U/L respectivamente mientras que los tratamientos 4 y 5 (sin administración de microalga) presentan un aumento correspondiente de 28 y 97 U/L, todos estos cambios en relación al tratamiento control. Lee *et al* (2006) reporta incremento en los niveles de las enzimas ALT y AST en Carpa durante un estudio de exposición crónica de nanopartículas de óxido de zinc.

En los parámetros albúmina, creatinina, proteínas totales y fosfatasa alcalina según los análisis estadísticos de comparación de medias al 95 % LSD Fisher demostró que los resultados no muestran ninguna tendencia ni diferencia significativa (tabla 15)

Tabla 15*Medias de resultados hematológicos varios*

Tratamientos	Creatinina (mg/dL)	Albumina (g/dL)	Proteína total (g/dL)	Fosfatasa Alcalina (U/L)
Control	0.2 ± 0.07 ^a	0.2 ± 0.06a	2.2 ± 0.18a	41.4 ± 7.81a
0.5 (ppm) CBM + <i>Chlorella sp.</i>	0.2 ± 0.03 ^a	0.1 ± 0.03a	2.8 ± 0.23a	25.5 ± 1.38a
0.75 (ppm) CBM + <i>Chlorella sp.</i>	0.2 ± 0.05 ^a	0.1 ± 0.01a	2.2 ± 0.14a	29.7 ± 0.92a
0.5 (ppm) CBM	0.2 ± 0.03 ^a	0.2 ± 0.08a	2.8 ± 0.19a	40.8 ± 13.15a
0.75 (ppm) CBM	0.18 ± 0.03 ^a	0.1 ± 0.04a	2.1 ± 0.23a	33.4 ± 3.33a

Tabla 16*Medias de los resultados hematológicos en comparativa con estándares bibliográficos*

Variables	Estandar	Control	Tratamientos			
			0.5 (ppm) CBM + <i>Chlorella sp.</i>	0.75 (ppm) CBM + <i>Chlorella sp.</i>	0.5 (ppm) CBM	0.75 (ppm) CBM
Hemoglobina (g/dL)	10.52	10.4	8.9	7.3	7.7	6.6
Hematocrito (%)	33.63	32.9	26.6	22.7	24.1	23.2
Creatinina (mg/dL)	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.18
Glucosa (mg/dL)	46	50.1	43.4	41.9	41.6	38.2
Albúmina (g/dL)	1.4	0.2	0.1	0.1	0.2	0.1
Proteína total (g/dL)	3.5	2.2	2.8	2.2	2.8	2.1
AST (U/L)	26	15.3	39.2	40.9	19.0	21.4
ALT (U/L)	-	164.0	92.6	136.4	192.6	261.0
Fosfatasa Alcalina (U/L)	-	41.4	25.5	29.7	40.8	33.4
Colinesterasa sérica (U/L)	-	2003.1	1488.1	1606.3	1598.0	1283.7

Fuente: (Figueiredo & Rocha, 2006)

En la tabla 19 se indica la comparación de los resultados hematológicos con los estándares internacionales.

4.4 Mortalidad en porcentaje del efecto de *Chlorella sp.* y la exposición de carbendazim en juveniles de tilapia híbrida.

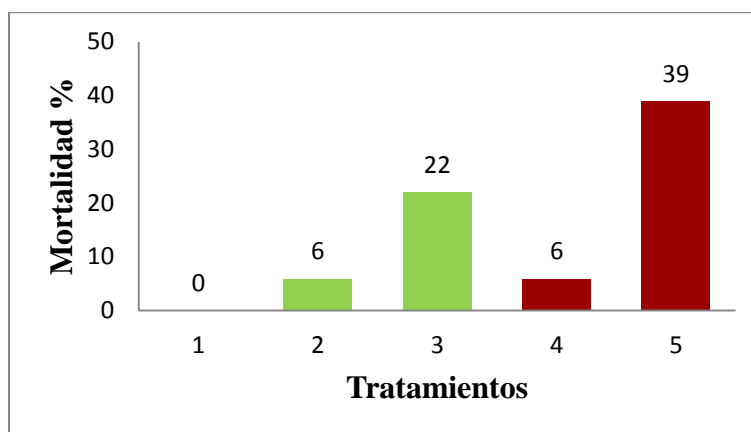


Figura 32 Porcentaje de mortalidad por tratamiento

En la figura 32 Se evidencia un aumento del porcentaje de mortalidad de tilapia directamente proporcional a la concentración de carbendazim, el tratamiento 5 se registró la mayor mortalidad

4.5 Variables histológicas

4.5.1 Tejido Branquial



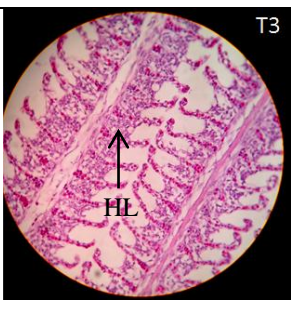
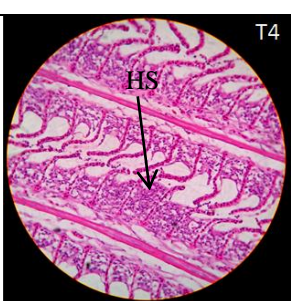
La Tabla 16 contiene imágenes comparativas (40X y 800X) de cortes histológicos realizados por histología clásica de hematoxilina y eosina (H-E) y microscopía electrónica de barrido (SEM) en branquias de juveniles de tilapia híbrida.

Las branquias de tilapia híbrida expuestas a concentraciones de carbendazim de 0.5 y 0.75 ppm mostraron espesamiento del epitelio lamelar primario. Efectos tóxicos similares se reportaron Neskovic *et al.*, (2000) en carpa por la aplicación de glifosato. Lo cual afecta a nivel respiratorio disminuyendo el intercambio gaseoso por daño lamelar.

Los tratamientos que fueron administrados con microalgas presentan un menor daño en comparación a los tratamientos que únicamente fueron expuestos a carbendazim en las mismas concentraciones.

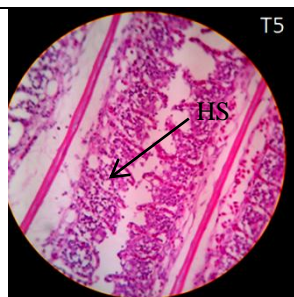
Tabla 17

Tejido branquial de tilapia híbrida mediante histología clásica H-E y microscopía electrónica de barrido SEM

Filamentos branquiales H-E 40X	Descripción
	<p>Estructura normal y homogénea de los filamentos branquiales.</p> <p>Disposición uniforme para el epitelio interlamelar</p>
	<p>Lamelas reducidas a un 50% del tamaño normal y simetría heterogénea.</p> <p>Tejido tratado con 0.5 ppm de carbendazim + microalga</p>
	<p>Hiperplasia leve en el epitelio interlamelar.</p> <p>Tejido tratado con 0.75 ppm de carbendazim + microalga</p>
	<p>Hiperplasia severa del epitelio interlamelar con disposición heterogénea de lamelas.</p> <p>Tejido tratado con 0.5 ppm de carbendazim</p>

CONTINÚA





Hiperplasia severa a nivel de todo el epitelio interlamelar con estructura anormal y heterogénea de lamelas.

Tejido tratado con 0.75 ppm de carbendazim



Lamela (L), epitelio interlamelar (EI), hiperplasia leve (HL), hiperplasia severa (HS)

4.5.2 Tejido hepático

La histología mostró que el fungicida carbendazim causa alteraciones de tejido hepático, como vacuolización, necrosis y vasodilatación. Los cambios en hígado observados son más evidentes en peces expuestos a altas concentraciones de carbendazim; sin embargo, el daño disminuye, tanto en el tamaño del hepatocito como en la vasodilatación de sinusoides, en los tratamientos con presencia de microalga. Estas alteraciones concuerdan con resultados publicados por Figueiredo-Fernandes *et al.*, (2006) demostrando una variedad de cambios en el hígado de *O. niloticus*, como resultado de la exposición a diferentes sustancias tóxicas.

Tabla 18

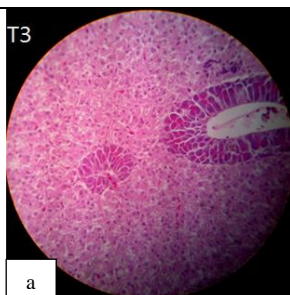
Vista del tejido hepático de tilapia híbrida mediante histología clásica H-E y microscopía electrónica de transmisión TEM

Tejido hepático	Descripción
H-E 40X	
	<p>b. Hepatocito con arquitectura normal</p> <p style="text-align: right;">CONTINÚA </p>



b. Vacuolización lipídica de hepatocitos

Tejido tratado con 0.5 ppm de carbendazin + microalga



b. Vacuolización lipídica reducida

Tejido tratado con 0.75 ppm de carbendazin + microalga



b. Vacuolización lipídica de hepatocitos a. Vasodilatación de sinusoides

Tejido tratado con 0.5 ppm



b. Aumento de tamaño en hepatocitos por vacuolización

a. Vasodilatación de sinusoides

Tejido tratado con 0.75 ppm de carbendazin

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

- La microalga *Chlorella sp.* biotipo 1, tiene un efecto terapéutico positivo reduciendo el efecto tóxico de carbendazim a nivel hematológico e histológico, en tilapia híbrida *Oreochromis sp.*
- Carbendazim se ubicó en una escala de toxicidad aguda 7.5 ppm (CL₅₀).
- En tilapia a nivel hematológico, el fungicida carbendazim ocasiona disminución en los parámetros normales: hemoglobina; hematocrito; glucosa y AST.
- Carbendazim a dosis sub letales (0.5 y 0.75 ppm), produce daños en órganos de juveniles de tilapia *Oreochromis sp.* En branquias, causa hiperplasia severa en el epitelio interlamelar y en tejido hepático, provoca vacuolización lipídica.
- *Chlorella sp* biotipo 1 presentó un efecto terapéutico positivo, disminuyendo los daños por la exposición a carbendazim en tilapia, mostrando niveles de hemoglobina, hematocrito y glucosa cercanos a los niveles normales.
- La microalga *Chlorella sp.* biotipo 1 incluida en la dieta balanceada para tilapia reduce el efecto toxico de carbendazim parámetros hematológicos e histológicos.

5.2 Recomendaciones

- Es recomendable el avance de estudios en modelos biológicos mamarios para conocer a profundidad los efectos tóxicos de carbendazim.
- Incluir la microalga *Chlorella sp* en la dieta balanceada para tilapia híbrida con el fin de reducir el efecto tóxico de pesticidas.
- Para establecer el potencial terapéutico de la microalga *Chlorella sp.* es importante realizar estudios complementarios con fines farmacéuticos y nutraceuticos.
- Se recomienda utilizar *Artemia salina* como modelo biológico para conocer el efecto tóxico de sustancias naturales o químicas.

5.3 Bibliografía

- Abdulrahman, N. (2014). Evaluation of Spirulina spp. as food supplement and its effect on growth performance of common carp fingerlings. *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies*, 89-92.
- Aeasar, A. (09 de 11 de 2015). *Ficha de de datos de seguridad Betaine anhydrous*. Obtenido de <https://www.alfa.com/es/content/msds/SouthAmerican/B24397.pdf>
- Aldoghachi, M., Azirun, M., Yusoff, I., & Aqeel, M. (2016). Ultrastructural effects on gill tissues induced in red tilapia *Oreochromis sp.* by a waterborne lead exposure. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 634-641.
- ASTM . (1980). Standard practice for conducting acute toxicity tests with fishes, macroinvertebrates and amphibians. *American Society for Testing and Materials*.
- Balseca, D. (2015). *Evaluación de buclizina en la alimentación de cuyes durante la etapa de engorde en el centro experimental Uyumbicho*. Obtenido de Repositorio Universidad Central del Ecuador: <http://www.dspace.uce.edu.ec:8080/bitstream/25000/6963/1/T-UCE-0014-051.pdf>
- Buenaño, M. (2010). Hemograma de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) en tres etapas de producción en la cuenca alta de la provincia del Napo, Ecuador. *Serie Zoológica*, 1-14.
- Camacho, R. (2009). Cultivo y elaboración de un producto comestible de *Chlorella vulgaris*. *Universidad Nacional Autónoma de México*, 16.
- Castro, R., & Aguilar, G. (2004). Evaluación del crecimiento de alevines de tres especies de Tilapia (*Oreochromis sp.*) en aguas duras, en la región de la Cañada, Oaxaca, México. *Revista AquaTIC*, 38-43.
- CEC. (1999). Community Strategy for Endocrine Disruptors, a range of substances suspected of interfering with the hormone systems of humans and wildlife. *COM 706*, 7.
- Collins, J. C. (2007). Challenges and opportunities in crop production over the next decade. *Pesticide Chemistry*, 3-12.
- Díaz, A., Pérez, H., & Sánchez, A. (2009). *Fisiología animal aplicada*. (*Oncorhynchus mykiss*): Editorial Universidad de Antioquia.
- Du Pont. (1991). Preliminary opinion of the scientific committee on plants regarding the evaluation of benomyl, carbendazim and the thiophanate-methyl in the context of council

directive 91/414/EEC concerning the placing of the plant protection products on the market.

El Baky, e. a. (2010). Enhancing antioxidant availability in grains of wheat plants grown under seawater-stress in response to microalgae extracts treatments. *J Sci Food Agric*, 299-303.

EPA. (2016). *OPP PESTICIDE ECOTOXICITY DATABASE*. Recuperado el 05 de 11 de 2016, de <http://www.ipmcenters.org/Ecotox/index.cfm>

Eric. (2012). *El uso de las algas en los alimentos acuícolas como alternativa a la harina de pescado*. Recuperado el 22 de 11 de 2015, de Aquafeed: <http://www.aquafeed.co/el-uso-de-las-algas-en-los-alimentos-acuicolas-como-alternativa-a-la-harina-de-pescado/>

Eric, H. (2012). El uso de las algas en los alimentos acuícolas como alternativa a la harina de pescado. *AQUAFEED International*.

FAO. (2005). Programa de información de especies acuáticas. *Oreochromis niloticus*. Texto de Rakocy, J. Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO. Roma.

FAO. (2016). El estado mundial de la pesca y la acuicultura.

Figueiredo, A., & Rocha, E. (2006). The Effect of Paraquat on Hepatic EROD Activity, Liver, and Gonadal Histology in Males and Females of Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*, Exposed at Different Temperatures. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 626.

Furuya, W. M. (2010). Tablas brasileiras para nutrición de tilapias. *Gráfica Editora*, 100.

Gapasin, H. (1998). Enrichment of live food with essential fatty acids and vitamin C: Effects on milkfish (*Chanos chanos*) larval performance. *Aquaculture*, 269–286.

Garofalo, R. (2011). Algae and aquatic biomass for a sustainable production of 2nd generation biofuels. *AQUAFUELS*, 99-101.

Hamasaki, K., & Sekiya, S. (1998). Dietary value for larval swimming crab *Portunus trituberculatus* of marine rotifer *Brachionus rotundiformis* cultured with several feeds. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 841–846.

Hernández. (2015). Hábitos alimentarios de la trucha común. Obtenido de Federpesca: <http://www.federpesca.com/habitos-alimentarios-de-la-trucha-comun/>

- Hernández, G., Hernández, L., Fernández, M., & López, O. (2012). Effects of total replacement of fishmeal with spirulina powder and soybean meal on juveniles rainbow trout. *The Israeli Journal of Aquaculture*, 790 - 798.
- Herrero, M., & Ibanez, E. (2006). Supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: Plants, food-by-products, algae and microalgae A review. *Food Chem*, 136-148.
- Hutadilok, N., Reanmongkol, W., & Panichayupakaranant, P. (2010). Evaluation of the toxicity of *Arthrospira platensis* extract. *Journal of Applied Phycology*, 599-605.
- Infante, C. (2012). Propagación de la microalga *Chlorella* sp. en cultivo por lote: cinética del crecimiento celular. *Avances en Ciencias e Ingeniería*, 159-164.
- Kanno, T., & Kazie, U. (2005). *Chlorella vulgaris*: Algas verdes japonesas medicinales como un modificador de la respuesta biológica. *Woodland Publishing*, 63.
- Lichtenthaler, H. (1987). Functional organization of carotenoids and prenylquinones in the photosynthetic membrane. In Stumpf PK, Mudd JB, David W (eds), *The Metabolism Structure, and Function of Plant Lipids*. *Plenum Press*.
- Mahasneh, I. (1997). Production of single cell protein from five strains of the microalga *Chlorella* spp. (Chlorophyta). *Cytobios*, 153–161.
- Mahmood, R., & Parry, J. (2001). Induction of micronuclei and chromosome non-disjunction after short-term exposure to carbendazim in cultured human lymphocytes. *31st annual meeting of the EEMS*.
- Maiz, A., Valero, L., & Briceño, D. (2010). *Elementos prácticos para la cría de trucha en venezuela*. Obtenido de http://www.produccion-animal.com.ar/produccion_peces/piscicultura/137-truchas.pdf
- Marshall, H. (2002). Carbendazim Fact sheet. *Pesticides News*, 20-21.
- Matsukawa, R., Hotta, M., Masuda, Y., Chihara, M., & Karube, I. (2000). Antioxidants from carbon dioxide fixing *Chlorella sorokiniana*. *Journal of Applied Phycology*, 263-267.
- Mihae, R. (2016). Biochemical profile of macro and micro algae and their implication for further commercial applications. *V Congreso Internacional de Acuicultura en Aguas Continentales ESPE*.

- Min, E. Y., & Kang, J.-C. (2008). Effect of waterborne benomyl on the hematological and antioxidant parameters of the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 138-143.
- Mohd, E. S., Sulaiman, S., Mohd Habib, S. H., Looi, M. L., Das, S., Abdul Hamid, N., . . . Mohd Yusof, Y. A. (2009). *Chlorella vulgaris* triggers apoptosis in hepatocarcinogenesis-induced rats. *J Zhejiang Univ Sci B*, 14-21.
- Muileman, H. (2016). *FACTSHEET CARBENDAZIM*. Recuperado el 05 de 11 de 2016, de <http://www.pan-europe.info/old/Campaigns/pesticides/documents/spotlight/PAN%20Europe%20factsheet%20on%20Carbendazim.doc>.
- Muñoz, M., Ramírez, J., Otero, A., Medina, V., Cruz, P., & Velasco, Y. (2012). Efecto del medio de cultivo sobre el crecimiento y el contenido proteico de *Chlorella vulgaris*. *Rev Colomb Cienc Pecu*, 438-449.
- Muñoz, P., Mardones, O., Vargas, L., & Gesto, M. (2015). *Estrés en peces: respuesta fisiológica y sus implicaciones en el cultivo de salmónidos*. Obtenido de Salmonexpert: <http://www.salmonexpert.cl/noticias/estres-en-peces-respuesta-fisiologica-y-sus-implicaciones-en-el-cultivo-de-salmonidos/>
- NCBI. (2016). CID=25429. *National Center for Biotechnology Information*.
- Ortiz, J., Ávalos, R., & Rueda, D. (2015). *Estrategias tecnológicas para la producción de microalgas andinas del Ecuador, aplicado a la biorremediación y nutrición de granjas pecuarias*. Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE, Grupo de Investigaciones en Recursos Bioacuáticos y Acuicultura, Sangolquí.
- Pino, O., & Lazo, F. (2010). Ensayo de Artemia: útil herramienta de trabajo para ecotoxicologas y químicos de productos naturales. *Revista Protección Vegetal*, 34 - 43.
- Plaza, M. (2010). Búsqueda de nuevos ingredientes funcionales naturales procedentes de algas. *Universidad Autónoma de Madrid*, 345 .
- Pokniak, J. (2007). Incorporación de espirulina en dietas para alevines de trucha arcoiris. *Avances en ciencias veterinarias*, 37-41.

- Rosenthal, S., Sandoval, N., Gavidia, C., & Tabacchi, L. (2013). Frecuencia de lipidosis hepática en trucha arco iris de fase juvenil en una piscigranja de la sierra central del Perú. *Revista de Investigaciones Veterinarias Perú*, 118-124.
- Salinas, I. (17 de junio de 2015). *El sistema inmunológico de los salmónidos y el potencial de las vacunas nasales*. Obtenido de Salmoexpert: <http://www.salmonexpert.cl/noticias/el-sistema-inmunolgico-olfativo-de-los-salmonidos-y-el-potencial-de-las-vacunas-nasales-en-salmonicultura/>
- Sánchez, L., & Neira, A. (2005). Bioensayo general de letalidad en *Artemia salina*, a las fracciones del extracto etanólico de *Psidium guajava*. L y *Psidium guineens*. *Cultura Científica*, 40 – 45.
- Sarmiento, D., & Torre, J. (2011). Eficiencia productiva de trucha arcoiris, bajo un sistema de recirculación de aguas con diferentes densidades de carga animal en la zona de Pailones, IASA, Ecuador. *Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE*, 131.
- Schlundt, H. (2002). Risks and benefits of biological and chemical plant protection strategies – food safety aspects. *Proc. British Crop Protection Conference 2002*, 3-21.
- SCP. (2001). *Preliminary opinion of the scientific committee on plants regarding the evaluation of benomyl, carbendazim and thiophanate-methyl in the context of council directive 91/414/EEC concerning the placing of the plant protection products on the market*. Recuperado el 05 de 11 de 2006, de http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scp/out98_ppp_en.html
- Shawkat, A. (2014). *Evaluation of the effects of feed attractants (Apitulina and ekangi) on growth performance, feed utilization and body composition of fingerlings of stinging cat fish*. Obtenido de Repositorio Universidad de Dhaka: <http://repository.library.du.ac.bd/xmlui/handle/123456789/494>
- Siefermann-Harms. (1985). Carotenoids in photosynthesis. I. Location in photosynthetic membranes and light-harvesting function. *Biochim. Biophys. Acta*.
- Tiril, S., Alagil, F., Yagci, F., & Aral, O. (2008). Effects of betaine supplementation in plant protein based diets on feed intake and growth performance in rainbow trout. *The Israeli Journal of Aquaculture*, 57-64.

- Torres, D., & Hurtado, V. (2011). Requerimientos nutricionales para tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*). *Orinoquia*, 63-68.
- Ucros, A. (2009). *Efectos del glifosato sobre el desarrollo embrionario de la trucha arcoíris (Oncorhynchus mykiss)*. Obtenido de Repositorio Pontificia Universidad Javeriana: <https://repository.javeriana.edu.co/handle/10554/8480>
- WHO. (1999). Recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification 1998-1999. *International Programme on Chemical Safety*.
- WHO FAO. (1996). Data sheet on pesticides. no.89, Carbendazim. *World Health Organization*.
- Yigit, N., & Keser, E. (2016). Effect of cellulase, phytase and pectinase supplementation on growth performance and nutrient digestibility of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fry fed diets containing canola meal. *Applied Ichthyology*, 938-942.
- Yoshimatsu, T., Imoto, H., Hayashi, M., Toda, K., & Yoshimura, K. (1997). Preliminary results in improving essential fatty acids enrichment of rotifer cultured in high density. *Hydrobiologia*, 153–157.