

# EVALUACIÓN POR ENSAYOS SEMI-ESTÁTICOS DE TOXICIDAD AGUDA DEL NH<sub>3</sub> EN ALEVINOS DE TILAPIA

## SEMI-ESTATIC TESTS FOR ACUTE TOXICITY OF NH<sub>3</sub> EVALUATION ON TILAPIA FINGERLINGS

Iván Andrés Sánchez Ortiz

E-mail: iaso@udenar.edu.co.

Departamento de Recursos Hidrobiológicos – Unversidad de Nariño, Colombia

---

### RESUMEN

#### Abstract

Excessive concentrations of unionized ammonia (NH<sub>3</sub>) in intensive systems or in wastewater-fed aquaculture could compromise fish survival or weight gain. The main objective of the present study was to evaluate the acute toxicity effect of NH<sub>3</sub> on fingerlings of Tilapia GIFT. Two 96 hours experiment were conducted in fingerlings with  $19,1 \pm 5,09$  g (first test) and  $6,54 \pm 1,94$  g (second test) average weights in aquariums of 20 liters of effective volume; 6 treatments were determined: T0–control – 0.0; T1– 0.5, T2- 0.89, T3-1.58, T4-2.81, T5-5.0 mg/L of NH<sub>3</sub> in four replicates in recirculating aquaculture systems. One fingerling died at the T5 in the first test, and 16 fingerlings died during the second test, indicating the resistance of the evaluated specie for concentrations up to 5 mg/L of unionized ammonia with higher sensibility for the smaller fish weight.

#### Resumen

Las excesivas concentraciones de amoníaco no ionizado (NH<sub>3</sub>) en sistemas de producción intensiva o en sistemas de piscicultura abastecidos con aguas residuales pueden comprometer la sobrevivencia o ganancia de peso de los peces. El principal objetivo de este estudio fue evaluar la toxicidad aguda del NH<sub>3</sub> en alevinos de tilapia GIFT. Se ejecutaron dos experimentos de 96 horas con alevinos con pesos medios de  $19,1 \pm 5,09$  g (primer ensayo) y  $6,54 \pm 1,94$  g (segundo ensayo) en acuarios de 20 litros de volumen efectivo; se determinaron seis tratamientos: T0–control – 0,0; T1– 0,5, T2- 0,89, T3-1,58, T4-2,81, T5-5,0 mg/L de N-NH<sub>3</sub> con cuatro repeticiones en sistemas de recirculación acuícola. Un alevino murió en el T5 en el primer ensayo, y murieron 16 alevinos en el durante el segundo ensayo, lo que indicó la resistencia de la especie evaluada a concentraciones de hasta 5 mg/L de amoníaco no ionizado, con mayor sensibilidad en peces con menor peso.

#### Introducción

Según Pereira y Mercante (2005), en los cultivos de peces, las concentraciones elevadas de amonio en la forma no ionizada (NH<sub>3</sub>) pueden perjudicar la transformación de la energía de los alimentos, inhibiendo el crecimiento de los animales, y que niveles de amoníaco entre 0,70 y 2,40 mg/L pueden ser letales para los peces, al ser expuestos por corto período de tiempo. Según Kubitza (2006), valores de NH<sub>3</sub> por encima de 0,20 mg/L ya son suficientes para inducir toxicidad crónica y reducir el crecimiento y la tolerancia de la tilapia a enfermedades.

En sistemas de producción intensiva y súper intensiva se generan altas concentraciones de amoníaco como resultado de las excreciones de los peces y de la descomposición anaerobia del alimento no consumido. Para lograr reducir las concentraciones del compuesto hasta niveles seguros para los peces se practica la sustitución periódica de cierto volumen de agua del sistema por agua fresca; sin embargo, en sistemas cerrados, cuando no hay suficiente agua para efectuar tal sustitución se utilizan biofiltros que realizan la nitrificación, transformando así el amoníaco en nitritos y nitratos.

En sistemas de recirculación para acuicultura (SRA) con problemas operacionales y en sistemas de producción piscícola abastecidos por efluentes domésticos tratados se pueden presentar concentraciones de  $\text{NH}_3$  que podrían generar altas mortalidades de los peces o comprometer de manera drástica el desempeño productivo.

Para cultivo de tilapia en SRA Timmons et al (2002) recomiendan valores de  $\text{NH}_3$  menores a 0,6 y de nitrógeno amoniacal total (NAT) menores a 3,0; Kubitza (2006) sugiere valores de  $\text{NH}_3$  menores a 0,2 mg/L. Para el caso de producción de tilapia en efluentes tratados, según Bartone (1986), es recomendable mantener las concentraciones de NAT en valores inferiores a los 2 mg/L para evitar efectos adversos por su toxicidad para los peces; sin embargo, diversos estudios han reportado concentraciones del orden de 8 a 12 mg/L en lagunas terciarias. Pese a que en la literatura se dispone de algunos criterios de diseño para los tanques de piscicultura con efluentes de lagunas de estabilización, aún no existe información conclusiva relativa a los criterios asociados al  $\text{NH}_3$ .

El objetivo de este trabajo fue la determinación, por medio de dos ensayos de toxicidad aguda, del nivel de letalidad que generarían diferentes concentraciones de amonio no ionizado en dos tamaños de juveniles de tilapia.

## **Materiales y métodos**

Los ensayos de toxicidad aguda se realizaron en el Laboratorio de Nutrición y Producción de Organismos Acuáticos, del Departamento de Zootecnia de la Universidad Federal de Viçosa (UFV), con base en aspectos metodológicos consignados en la Norma Brasileira NBR 15088 (ABNT, 2004) - Eco-toxicología acuática para evaluar toxicidad aguda - Método de ensayo con peces. Se realizaron dos ensayos semi-estáticos para evaluar cinco diferentes concentraciones de amoníaco, además de un control -sin adición del compuesto, con cuatro repeticiones por cada tratamiento. Las concentraciones de  $\text{NH}_3$  evaluadas se determinaron a partir de una escala logarítmica definiendo como valores máximo y mínimo 5 y 0,5 mg/L de  $\text{NH}_3$  respectivamente; con base en ello, las concentraciones intermedias fueron 2,81, 1,58, y 0,89 mg/L.

Las concentraciones pretendidas fueron controladas diariamente por medio de la adición de una solución patrón, cuya preparación se describe en la metodología 4500-Norg.D de Standard Methods (APHA et al., 2005).

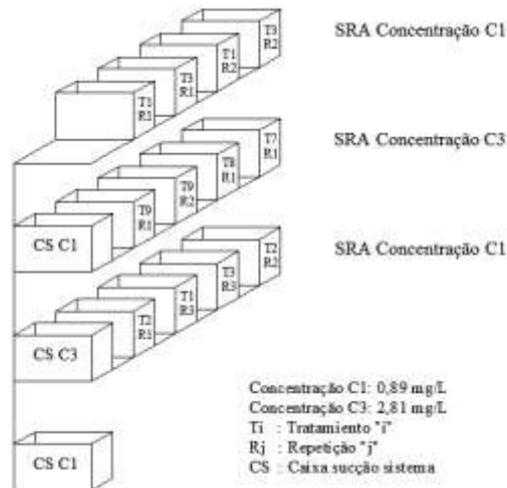
Los SRA correspondientes a cada uno de los 5 tratamientos y el control, estuvieron conformados por cinco acuarios de material plástico transparente, cuatro de ellos utilizados para cultivo de los peces y un quinto para recepción de los efluentes de las unidades de cultivo de cada SRA y posterior bombeo para su recirculación; todas las unidades de cultivo contaron con una piedra difusora para inyección de aire proveniente de un *blower* marca Ibram, modelo CR0695.

Para controlar el nivel del agua en los acuarios y para facilitar la remoción del líquido del fondo con los sólidos sedimentados, se dispuso en una de las caras laterales, a 5 centímetros de la base, un orificio lateral de ½” conectado a segmentos de tubo que formaban una “u” invertida; el líquido que salía de cada unidad era colectado en una canaleta de PVC de 50 mm de diámetro, que llevaba el agua hacia el acuario que hizo las veces de sedimentador, donde una bomba marca Robertshaw, modelo BAV1100-01UC enviaba el efluente por tubería de ½” de regreso hacia una red de distribución a los acuarios. En la Figura 1 se presenta una imagen con seis de los sistemas de recirculación utilizados en el experimento.



**Figura 1.** Vista del laboratorio donde se ejecutaron los ensayos

Un ejemplo de la disposición espacial de las unidades de cultivo que conformaron los tratamientos y sus respectivas repeticiones en los sistemas de recirculación está ilustrado a continuación en la Figura 2.



**Figura 2.** Esquema de la disposición espacial de los tratamientos evaluados

Según lo recomendado por la literatura para los ensayos semi-estáticos, se realizó sustitución del líquido utilizado una vez cada 24 horas. Para la sustitución diaria del líquido en los acuarios se utilizó agua libre de cloro, a la cual se le adicionó solución de tiosulfato de sodio.

La dureza del agua se determinó diariamente por medio de titulación, y se efectuó la corrección de su valor hasta un valor entre 40 y 48 mg/L de CaCO<sub>3</sub> por medio de la adición de las soluciones para preparación de agua de dilución definidas en la norma NBR 15088. Adicionalmente, para efectos del experimento se decidió establecer un valor fijo de pH inicial del agua de 8,0, cuyo valor fue ajustado diariamente en el agua utilizada en cada tratamiento –después de la preparación del líquido con las soluciones para control de la dureza y de a concentración de NH<sub>3</sub><sup>-</sup>, por medio de la adición de HCl o NaOH.

La medición del pH inicial, así como del oxígeno disuelto y de la temperatura en los tanques de succión de los tratamientos se realizó por medio de una sonda multi paramétrica marca HACH (USA), modelo HQ40d; por su parte, la medición del NH<sub>3</sub> se efectuó por medio de una sonda ISENH318101, marca HACH, Loveland-Colorado USA.

Para el primer experimento en cada uno de los 24 acuarios utilizados -5 tratamientos y el control con sus 4 repeticiones- se dispusieron 10 peces de la línea GIFT (*genetically improved farmed tilapia*) con peso medio de 19,1 ± 5,09 g. Durante el segundo experimento se evaluaron las 4 mayores concentraciones estudiadas en el primer ensayo, adicionalmente se evaluaron tres densidades de siembra: 5, 10 y 20 peces/acuario con peso medio de 6,54 ± 1,94 g, la combinación de estos dos factores reportó 12 tratamientos, que contaron con 4 repeticiones. Ya que en la segunda fase se hizo necesario controlar las concentraciones del NH<sub>3</sub> por medio de sistemas de recirculación independientes, se adoptó un diseño por bloques al azar; y como se evaluaron densidades de siembra mayores, se decidió incorporar el uso de las piedras difusoras para evitar concentraciones de oxígeno disuelto menores a 6,0 mg/L. La distribución espacial de los sistemas de recirculación para cada concentración de amoníaco se hizo de manera aleatoria, así como la localización de los acuarios para cada densidad de siembra.

Tres días antes del inicio de los experimentos, se realizó la biometría de los peces para su disposición en los acuarios correspondientes; para tal fin se aplicó una solución de anestésico eugenol en el agua, para tranquilizar los ejemplares y facilitar su manipulación y pesado. Durante los días que antecedieron a los experimentos se alimentó a los peces 3 veces por día utilizando concentrado con 38% de proteína, y se suspendió el suministro del alimento durante las 96 horas del experimento, así como 24 horas antes del inicio del mismo.

## Resultados y discusión

### Primer ensayo

El valor medio inicial de la dureza en el ensayo antes de su corrección fue de 35,0 ± 2,78 mg/L de CaCO<sub>3</sub>, y los valores medios iniciales de pH, temperatura y oxígeno disuelto fueron de 7,8 ± 0,10, 27,2 ± 0,04 °C y 6,80 ± 0,19 mg/L de OD. El promedio de los valores registrados para los parámetros de calidad del agua monitoreados en el líquido cada 24 horas durante el primer ensayo se presentan a continuación en la Tabla 1:

**Tabla 1.** Calidad del agua en los sistemas de recirculación, ensayo 1

Parámetro	Valores médios cada 24h
-----------	-------------------------

pH inicial	7,58 ± 0,20
Dureza inicial (mg/L de CaCO <sub>3</sub> )	41,8 ± 1,59
Temperatura en el sistema (°C)	27,2 ± 0,00
Oxígeno disuelto en el sistema (mg/L)	7,12 ± 0,08

Se pudo apreciar que los parámetros de calidad del líquido se encontraron dentro de los rangos recomendados por Timmons et al. (2002) para el cultivo de tilapia.

Los valores medios de las concentraciones de NH<sub>3</sub> medidas en los sistemas de recirculación después de cada 24 horas fueron: 0,06 mg/L para el control y de 0,38, 0,64, 0,87, 1,83, 3,89 mg/L para los tratamientos T1, T2, T3, T4 y T5 respectivamente. Los valores medios de los porcentajes de amonio perdidos diariamente en relación a las concentraciones inicialmente establecidas fueron de 24,84, 27,84, 44,77, 34,73 y 22,19% para los tratamientos antes comentados.

Durante las 96 horas del ensayo únicamente se registró la mortalidad de un ejemplar en el tratamiento T5, dicha situación ocurrió en el transcurso del tercer día de experimento, aproximadamente a la hora 60. Por haberse registrado tan solo un deceso en los peces no fue posible calcular el valor de la concentración LC50; adicionalmente, la presencia de concentraciones de hasta 5,0 mg/L no comprometería la estabilidad del cultivo, al menos en términos de la sobrevivencia por un periodo de 96 horas.

### Segundo ensayo

El promedio de los valores registrados para los parámetros de calidad del agua monitoreados diariamente en el líquido cada 24 horas durante el segundo ensayo se presentan a continuación en la Tabla 2:

**Tabla 2.** Calidad del agua en los sistemas de recirculación, ensayo 2

<b>Parámetro</b>	<b>Valores medios cada 24h</b>
pH inicial	7,32 ± 0,22
Temperatura en el sistema (°C)	24,95 ± 0,49
Oxígeno disuelto en el sistema (mg/L)	7,51 ± 0,05

Los valores de los parámetros de calidad del agua presentados en la anterior tabla nuevamente se encontraron dentro de los rangos recomendados por autores como Kubitza (1998), y Timmons et al. (2002) para el cultivo de tilapia.

Al comparar las concentraciones de NH<sub>3</sub> medidas en el ensayo cada 24 horas con las inicialmente proporcionadas de 0,89; 1,58; 2,81 y 5,0 mg/L de NH<sub>3</sub> se determinó que los porcentajes medios perdidos por los sistemas C1, C2, C3 y C4 fueron de 54,6, 43,5, 38,8 y 24,5% respectivamente.

Las pérdidas del amoníaco pueden haberse producido por volatilización del compuesto como resultado de la permanente circulación del líquido; por la caída del agua al salir de los cuatro acuarios de cada sistema de recirculación y su paso hacia la canaleta de recolección; por la salida del líquido de la canaleta y su caída al tanque de sedimentación y succión; por la salida de los grifos que derivaron el agua del tubo de distribución del líquido bombeado hacia las unidades de cultivo; y en el caso del segundo experimento, por la aireación suministrada. Dicha situación evidenció la

necesidad de realizar la sustitución de las soluciones evaluadas cada 24 horas, pues debido a la volatilidad del compuesto se justifica plenamente el tipo de metodología según el ensayo semi-estático.

Se observó en ambos experimentos la reducción del pH inicial hasta valores cercanos a la neutralidad, lo cual pudo deberse por la presencia de CO<sub>2</sub> producido en la respiración de los peces, pues autores como Hargreaves y Brunson (1996) y Vinatea (2004) afirmaron que el dióxido de carbono actúa como un ácido en el agua, y junto con ácidos orgánicos, ácidos minerales y sales de fuerte acidez son, generalmente, responsables por la acidez de las aguas naturales.

A lo largo del segundo ensayo murieron en total 16 peces, lo que representó 2,86% de los animales utilizados, 13 de ellos en el primer día, 2 en el tercer y uno en el cuarto día. De los peces muertos, 1 correspondió a la concentración de 0,89 mg/L, 4 a la de 2,81 mg/L y 11 a la de 5,00 mg/L de NH<sub>3</sub>; adicionalmente, 5 correspondieron a la densidad de 5 peces/acuario, 6 a la de 10 peces/acuario y 5 a la de 20 peces/acuario.

A partir de los datos obtenidos, se realizó el análisis de varianza con nivel de significancia del 5%. La prueba F fue significativa tanto para los tratamientos, ello indicó que los tratamientos y los bloques ejercieron efectos estadísticamente significativos sobre la mortalidad de las tilapias. Con base en tal situación, se analizaron los efectos de los dos factores y su eventual interacción y se obtuvo que la prueba F fue significativa para el factor Concentración de NH<sub>3</sub> y no significativa para el factor Densidad de siembra ni para la interacción de los dos factores, indicando que solamente las concentraciones del amonio afectaron de manera estadísticamente significativa la mortalidad de los peces.

Se aplicó la prueba de comparaciones múltiples de Tukey, cuyo resultado indicó que únicamente la concentración de 5,0 mg/L de NH<sub>3</sub> ejerció efecto significativo en la mortalidad de los alevinos, con mayores niveles de letalidad para la condición de densidad de siembra de 10 peces/acuario.

En general, estos resultados se encuentran en concordancia con lo reportado por Karasu y Köksal (2005), quienes efectuaron ensayos de toxicidad aguda por 48 horas con *Oreochromis niloticus* L, aplicando concentraciones de amoníaco hasta de 11,69 mgNH<sub>3</sub>/L y calcularon una LC50 del orden de 7,40 ± 0.01 mg/L de NH<sub>3</sub>. Ya que la mortalidad registrada para los dos tamaños de peces evaluados fue diferente se recomienda realizar estudios adicionales para peces con tamaños menores y así predecir los efectos agudos del amoníaco en las fases iniciales de crecimiento de la tilapia, que permitan estimar valores límite de NH<sub>3</sub> que permitan la operación segura de sistemas de recirculación o tanques para cultivo de los peces en efluentes tratados y que eviten así su mortalidad.

## **Conclusiones**

Los resultados obtenidos indicaron la resistencia de la especie a los efectos agudos de altas concentraciones de amoníaco de hasta 5,0 mg/L; sin embargo, tal resistencia disminuye con el tamaño de los peces.

Los alevinos de tilapia pueden soportar los efectos agudos del NH<sub>3</sub> sin reportar excesiva mortalidad hasta por 96 horas consecutivas siempre y cuando se mantengan en valores apropiados los niveles de parámetros como temperatura, oxígeno disuelto, pH y dureza.

Los ensayos semi-estáticos utilizando sistemas de recirculación son métodos apropiados para evaluar la toxicidad aguda del amoníaco en tilapia línea GIFT.

### **Recomendación**

Se recomienda efectuar estudios adicionales de toxicidad aguda en la especie para tamaños de peces menores, así como ensayos de toxicidad crónica para evaluar los efectos de concentraciones no letales a largo plazo.

**Palabras clave.** Toxicidad aguda, alevinos, amoníaco no ionizado

**Key words.** Acute toxicity, fingerlings, unionised ammonia **Palabras clave.** Toxicidad aguda, alevinos, amoníaco no ionizado

**Key words.** Acute toxicity, fingerlings, unionised ammonia

### **Referencias bibliográficas**

ABNT -Associação Brasileira de Normas Técnicas. (2004) *Ecotoxicologia aquática – Toxicidade aguda – Método de ensaio com peixes, Norma ABNT-NBR 15088*. ABNT, Rio de Janeiro.

APHA, AWWA and WPCF. (2005) *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 21.ed. American Public Health Association APHA, Washington DC.

Bartone, C. (1986) Reutilización de aguas residuales en las lagunas de estabilización de San Juan de Miraflores. Repercusiones sanitarias, ambientales y socioeconómicas, *Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana (OSP)*, **101**(5), 425-451.

Hargreaves, J.; Brunson, M. Carbon Dioxide in Fish Ponds, SRAC Publication No. 468. Stoneville, Mississippi: Southern Regional Aquaculture Center. 1996. 6 p.

Karasu, A. and Köksal, G. (2005) The Acute Toxicity of Ammonia on Tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) Larvae and Fingerlings, *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, **29**, 339-344.

Kubitza, F. Qualidade da água na produção de peixes - Parte I. Panorama da Aqüicultura, v. 8, n. 45, p. 36-41. 1998.

Kubitza, F. Sistemas de Recirculação: Sistemas fechados com tratamento e reuso da água. Panorama da Aqüicultura, v. 16, n. 95, p. 15-22. 2006.

Pereira, L. P.; Mercante, C. T. A amônia nos sistemas de criação de peixes e seus efeitos sobre a qualidade da água. B. Inst. Pesca. v. 31, n. 1, p. 84-88. 2005.

Timmons M., Ebeling, J., Wheaton, F., Summerfelt, S. and Vinci, B. (2002) *Sistemas de Recirculación para la Acuicultura*. 2 ed. Quebecor World Chile S.A, Santiago de Chile. 746 pp.

Vinatea, A. L. Princípios químicos de qualidade da água em aqüicultura, segunda edição. Florianópolis: Editora da UFSC. 2004. 345 p.

