

Determinación de la concentración letal media (CL₅₀) producida por el sulfato de cobre pentahidratado en diez especies de peces dulceacuícolas bioindicadores utilizados en el Perú

Determination of medium lethal concentration (LC₅₀) produced by pentahydrate copper sulfate in ten species of freshwater fish bioindicators used in Perú

Carlos Scotto,¹ Raúl Rondón,² César Arriola,³ Félix Alvarez^{2,4}

RESUMEN

El sulfato de cobre pentahidratado (CuSO₄.5H₂O) es utilizado en la acuicultura como un potente alguicida y/o molusquicida; pero el uso excesivo e indiscriminado puede conllevar a tener grandes daños en los cultivos de especies acuáticas silvestres no objetivo. La presente investigación determinó un rango de dosis letal media del sulfato de cobre entre 0.16 y 1.6 mg/L para diez especies de peces continentales: Neón Tetra (Paracheirodon Innesi), Dorado (Carassius auratus), Guppy (Poecilia reticulata), Bagre ventosa (Otocinclus macrospilus), Barbo (Barbus tetrazona), Molly (Poecilia sphenops), Monjita (Gymnocorymbus ternetzi), Espada (Xiphophorus helleri), Platy (Xiphophorus maculatus) y Corydora (Corydora aeneus). Para ello se realizó un ensayo preliminar de diez concentraciones seriadas por 24 horas con dos repeticiones. Seguidas de un ensayo final con cinco concentraciones seriadas a las 24, 48, 72, 96 y 120 horas de exposición. Posteriormente, se realizó el análisis con el programa Probit y se determinó que las CL₅₀ fueron respectivamente de: 0,8mg/L,24h; 1,2mg/L,96h; 0,4mg/L,96h; 1,2mg/L,48h; 0,8mg/L,48h; 0,16mg/L,24h; 0,8mg/L,24h; 0,1652mg/L,24h; 1,6mg/L,24h y 0,6mg/L,96h.

Palabras claves: Alguicida, molusquicida, sulfato de cobre, bioensayo, concentración.

ABSTRACT

Copper sulfate pentahydrate (CuSO₄.5H₂O) is used in aquaculture as a potent algicide and/or molluscicide. But excessive and indiscriminate use can lead to extensive damage to the crops of non-target wild aquatic species. The present investigation determined a range of average lethal dose of copper sulfate between 0.16 and 1.6mg/L for ten species of continental fish: Neon Tetra (Paracheirodon Innesi), Goldfish (Carassius auratus), Guppy (Poecilia reticulata), Windy catfish (Otocinclus macrospilus), Barbo (Barbus tetrazona), Molly (Poecilia sphenops), Monjita (Gymnocorymbus ternetzi), Sword tail (Xiphophorus helleri), Platy (Xiphophorus maculatus) and Corydora (Corydora aeneus). For this, a preliminary test of ten serial concentrations was carried out for 24 hours with two repetitions. Followed by a final trial with five serial concentrations at 24, 48, 72, 96 and 120 hours of exposure. Subsequently, the analysis was performed with the Probit program and it was determined that the LC₅₀ were respectively: 0.8mg/L,24h, 1.2mg/L, 96h; 0.4mg/L,96h; 1.2mg/L,48h; 0.8mg/L, 48h; 0.16mg/L,24h; 0.8mg/L,24h; 0.1652mg/L,24h; 0.6mg/L,24h and 1.6mg/L,96h.

Keywords: Algicide, molluscicide, copper sulfate, bioassay, concentration.

1.Mg.Blg. Docente de Genética de la Facultad de Ciencias de la Universidad Ricardo Palma, Email: carlos.scotto@urp.edu.pe

2.Docente de la Facultad de Ciencias Naturales y Matemática. Universidad Nacional Federico Villarreal. Email: rarondon@unfv.edu.pe

3.Dr. Docente de la Universidad César Vallejo. Filial Este, carriolap15@gmail.com

4. Docente de la Facultad de Ciencias Naturales y Matemática. Universidad Nacional Federico Villarreal. Email: falvarez@unfv.edu.pe,



INTRODUCCIÓN

Actualmente, el Mundo depende en gran medida de productos químicos para satisfacer sus necesidades en general. A pesar de la evidencia de tiempo atrás, que se tiene acerca de la relación de los efectos tóxicos de los xenobióticos sobre el entorno, la biocenosis y la salud humana. Actualmente, se han desarrollado una gran variedad de bioensayos que han empleado especies de peces sensibles a la presencia de determinados agentes tóxicos (1, 2).

El sulfato de cobre pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) es usado en la acuicultura como alguicida y molusquicida (3, 4). Los peces expuestos a altas concentraciones de cobre (2 a 4 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) por cortos periodos de tiempo, manifiestan cuadros de hiperexcitación, alternados con letargia y pérdida del eje de nado, con tendencia a ubicarse en la superficie del agua ("boqueo"). Y bajo exposiciones crónicas, se observan alteraciones en el sistema neurológico y endocrino, así como cambios celulares, bioquímicos y fisiológicos (5, 6).

Los reportes del CL50 del sulfato de cobre pentahidratado en peces dulceacuícolas son escasos. Así, algunos investigadores mencionan a la Cachama blanca (*Piaractus brachypomus*) con un $\text{CL}_{50-48\text{h}} = 0,94 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (7), al Carachi Amarillo (*Orestias luteus*) con un $\text{CL}_{50-72\text{h}} = 1,653 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (8), a la Carpa común (*Cyprinus carpio*) con un $\text{CL}_{50-96\text{h}} = 0,986 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (9), al pez Guppy (*Poecilia reticulata*) con un $\text{CL}_{50-24\text{h}} = 1,17 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (10), al pez Cebra (*Danio rerio*) con un $\text{CL}_{50-96\text{h}} = 0,1875 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (11), a la Tilapia (*Oreochromis sp.*) con un $\text{CL}_{50-72\text{h}} = 1,54 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (6), a la Trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) con un $\text{CL}_{50-96\text{h}} = 0,403 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (12) y a la Capoeta umbla con un $\text{CL}_{50-96\text{h}} = 1,478 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (13).

La composición taxonómica de los peces continentales del Perú está conformada por 1062 especies para el Perú (14, 15). Los peces ornamentales exóticos introducidos al Perú provienen generalmente de países africanos y asiáticos y corresponden a los órdenes Cypriniformes, Per-

ciformes, Cyprinodontiformes y Characiformes y a las familias Cyprinidae, Osphronemidae, Cichlidae, Poeciliidae y Characidae (16).

En la Figura 1, el pez Neón Tetra (*Paracheirodon innesi*) pertenece al Orden Characiformes (Familia Characidae). Son peces amazónicos (temperaturas entre 21 a 28°C, pH entre 5,5 a 6,0) (17).

El pez Dorado (*Carassius auratus*) (Familia Cyprinidae). Son peces asiáticos (temperaturas entre 14 a 24°C, pH entre 7 a 7,5) (18). El pez Guppy (*Poecilia reticulata*) pertenece al orden de los ciprinodontiformes (Familia Poeciliidae). Son peces sudamericanos que viven entre los 22 y 28 °C (19).

El pez Otocinclus (*Otocinclus macrospilus*) es una especie nativa de América del Sur del orden de los Siluriformes (Familia Loricariidae) (temperatura entre 20 a 25°C, pH entre 5,5 a 7,5) (20). El Barbo tigre (*Puntius tetrazona*) es originario de Indonesia, Sumatra y Borneo (temperatura entre 20 a 28°C, pH entre 6 a 8) (17).

El pez Molly (*Poecilia sphenops*) pertenece al orden de los ciprinodontiformes (Familia Poeciliidae) (temperatura promedio de 21 a 28°C, pH entre 7,0 a 8,5) (21). El pez Monjita (*Gymnocorymbus ternetzi*) pertenece a la orden de los Characiformes (Familia Characidae).

Es una especie nativa de la cuenca Amazónica y del Orinoco (temperaturas entre 20 a 26°C) (14). El pez Espada (*Xiphophorus helleri*) pertenece al orden de los ciprinodontiformes (Familia Poeciliidae) y habita Centroamérica (temperatura entre 22 a 26°C, pH 6,5 a 7,5) (22).

El pez Platy (*Xiphophorus maculatus*) del orden de los ciprinodontiformes (Familia Poeciliidae), oriundo de Centroamérica (temperatura entre 25 a 26°C, pH de 7 a 8) (23). El pez Coridora (*Corydora aeneus*) del orden de los Siluriformes (familia Callichthyidae), originario de América del Sur (temperatura entre 22 a 25°C, pH 6 a 7,5) (24).

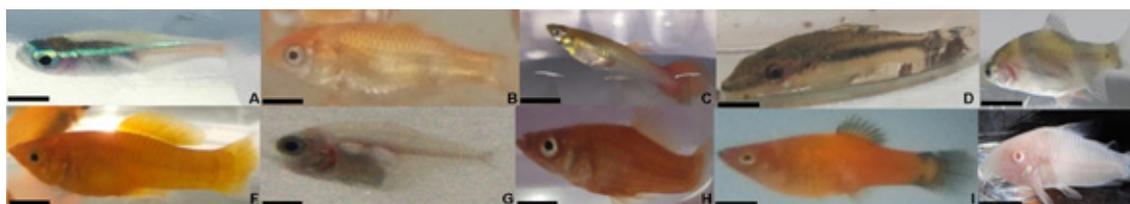


Figura N°1. Especies de peces analizados

a) Neon Tetra (*Paracheirodon innesi*), b) Pez Dorado (*Carassius auratus*), c) Guppy (*Poecilia reticulata*), d) Otocinclus (*Otocinclus macrospilus*), e) Barbo (*Barbus tetrazona*), f) Pez Molly (*Poecilia sphenops*), g) Monjita (*Gymnocorymbus ternetzi*), h) Pez Espada (*Xiphophorus helleri*), i) Pez Platy (*Xiphophorus maculatus*) y j) Coridora (*Corydora aeneus*). Escala 1 cm.

MÉTODOS Y MATERIALES

Aclimatación y acondicionamiento:

Los peces adquiridos de acuarios de las ciudades de Lima e Iquitos fueron aclimatados previamente por una semana previa a los ensayos en acuarios de 100 litros de agua desgasificada de la marca San Luis® (pH entre 7 a 7,6, conductividad entre 83,1 a 84,2 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ y oxígeno disuelto 4,29 a 4,31 $\text{mgO}_2\cdot\text{L}^{-1}$).

Y fueron mantenidos a una temperatura promedio de 25 a 26°C con termostatos sumergibles (Marca Aquarium Heater, Modelo MJ-HH100W). Y fueron alimentados ad libitum dos veces al día con alimento seco en hojuelas para peces de la marca Sera®. El fotoperíodo se fijó en 12 horas luz y 12 horas de oscuridad.

Los bioensayos con el sulfato de cobre pentahidratado se realizaron en el laboratorio de Mejora Genética y Reproducción Animal de la Universidad Nacional Federico Villarreal (UNFV) en la ciudad de Lima durante los años 2018 y 2019.

Sulfato de cobre pentahidratado:

Para los bioensayos se preparó una solución stock de 40 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de Sulfato de cobre Q.P. (99,25%) de la marca ARIS Industrial con un peso molecular de 349,66 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$, densidad de 1,3 $\text{g}\cdot\text{cc}^{-1}$, pH entre 3,8 y 4,5 y 100% soluble en agua (25).

Ensayo preliminar seriado para determinar el potencial CL50 con sulfato de cobre pentahidratado a 24 horas de exposición:

Los peces fueron utilizados a partir de la segunda semana de aclimatación. Para las pruebas de toxicidad preliminar o de tanteo se prepararon diez concentraciones distintas seriadas del sulfato de cobre: 2,0; 1,8; 1,6; 1,4; 1,2; 1,0; 0,8; 0,6; 0,4 y 0,2 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ más el control con dos repeticiones por cada especie de ictícola.

Se utilizó recipientes de plástico de 1L con tapa se enrazó a un volumen final de 500 mL con agua desgasificada. Se utilizó como control agua desgasificada sin sulfato de cobre. Y a cada concentración se le agregó seis peces cumpliendo con las 3 R's de bioética con animales de experimentación de (26). Y se observaron los resultados a las 24 horas de exposición para evidenciar el inicio de la mortandad de los peces y en qué rango de concentración podría ubicarse el CL50 (Figura 2).

Ensayo final por selección de cinco concentraciones cercanas al CL50 del sulfato de cobre a 24, 48, 72, 96 y 120 horas de exposición:

A partir de los resultados obtenidos de los ensayos preliminares se prepararon cinco concentraciones distintas de sulfato de cobre ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$). Dos de ellas a concentraciones superiores y dos a con-

centraciones inferiores del CL50 determinado en el ensayo preliminar. Se utilizó la misma metodología de preparación del ensayo preliminar.

Se utilizó como control agua desgasificada sin sulfato de cobre.

A cada concentración se le agregó seis peces más el control con tres repeticiones. Y se observó los resultados a las 24, 48, 72, 96 y 120 horas de exposición. Se verificó cada 24 horas la secuencia de muerte de los peces que fue registrada diariamente hasta completar los cinco días de exposición (Figura 2).



Figura N° 2. A. Ensayo preliminar o de tanteo para determinar el posible CL50 del sulfato de cobre pentahidratado en peces a las 24 horas de exposición. B. Ensayo final para determinar el CL50 del sulfato de cobre realizado a las 24, 48, 72, 96 y 120 horas de exposición.

Análisis estadístico:

Se utilizó el programa de computación Probit (Versión 1.5) (27) para el análisis de datos con el fin de calcular la CL50 mediante una regresión concentración-respuesta.

RESULTADOS

Tabla N° 1. Resultados finales obtenidos del CL50 del sulfato de cobre pentahidratado en los peces dulceacuícolas analizados.

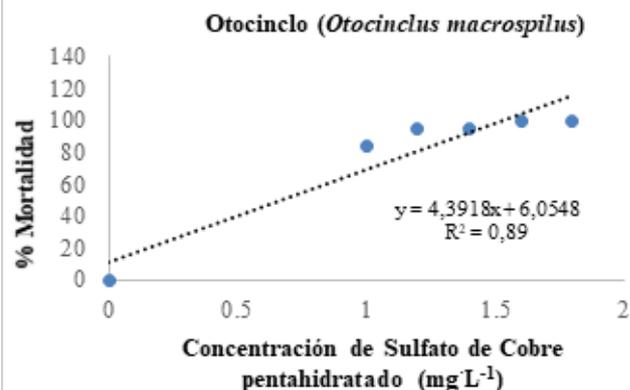
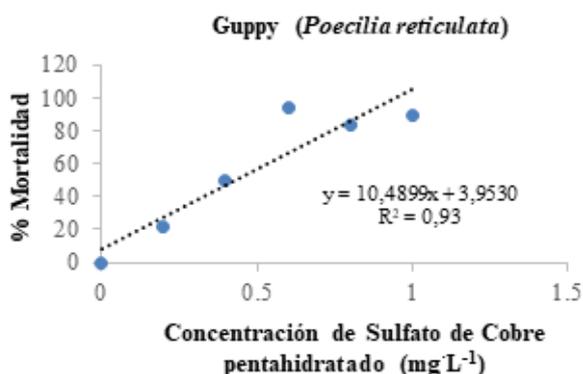
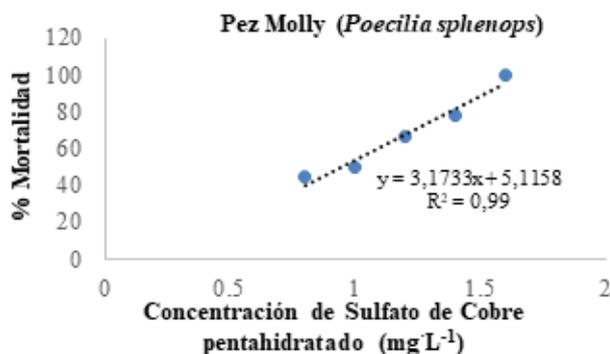
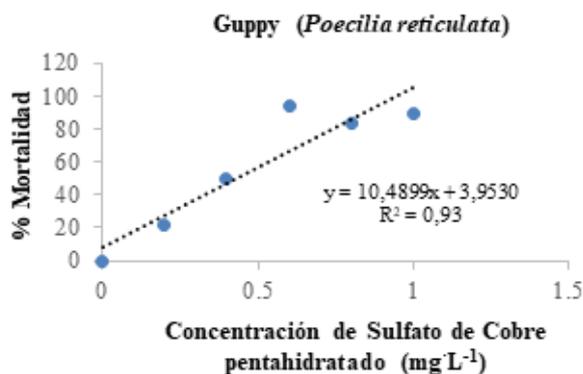
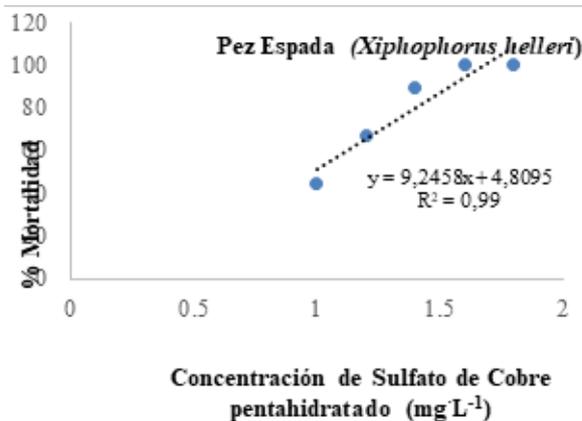
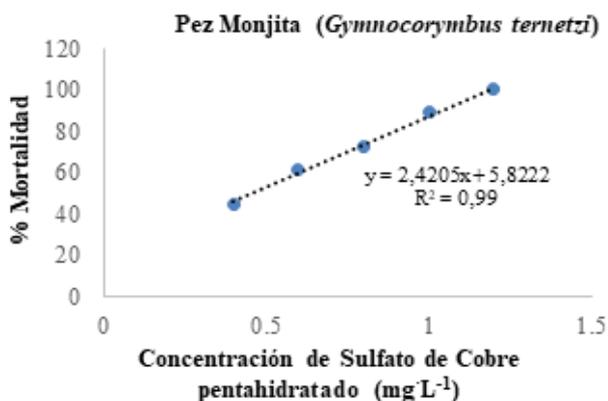
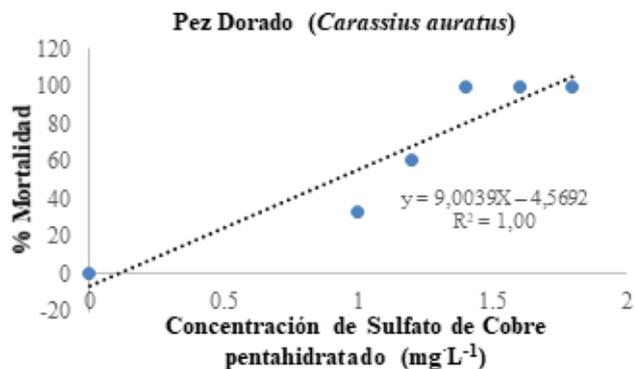
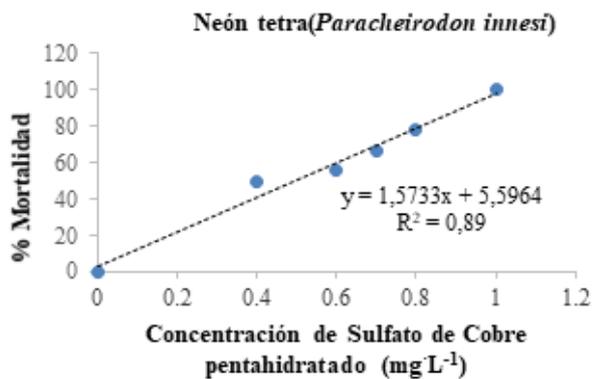
Especie Ictícola	Rango de CL ₅₀ a las 24 horas	CL ₅₀ (mg/L)	Ecuación de Regresión Probit	Coefficiente de correlación (r)	Tiempo de exposición
Neón tetra (<i>Paracheirodon innesi</i>)	0.4 – 0.6	0,417	$y = 1,5733x + 5,5964$	0,89	120 horas
Pez Dorado (<i>Carassius auratus</i>)	1.0 - 1.2	1,116	$y = 9,0039X - 4,5692$	1,00	96 horas
Pez Guppy (<i>Poecilia reticulata</i>)	1.2 - 1.4	1,258	$y = 10,4899x + 3,9530$	0,93	96 horas
Otocinclus (<i>Otocinclus macrospilus</i>)	0.4 - 06	0,575	$y = 4,3918x + 6,0548$	0,89	48 horas
Barbo Sumatran (<i>Puntius tetrazona</i>)	0.1 - 0.2	0,116	$y = 0,8782x + 4,9001$	0,90	72 horas
Pez Molly (<i>Poecilia sphenops</i>)	0.8 – 1.0	0,919	$y = 3,1733x + 5,1158$	0,94	120 horas
Pez Monjita (<i>Gymnocorymbus ternetzi</i>)	0.4 - 0.6	0,457	$y = 2,4205x + 5,8222$	0,99	24 horas
Pez Espada (<i>Xiphophorus helleri</i>)	1.0 – 1.2	1,048	$y = 9,2458x + 4,8095$	0,99	72 horas
Pez Platy (<i>Xiphophorus maculatus</i>)	1.6 – 1.8	1,563	$y = 14,866x + 2,1125$	0,97	72 horas
Coridora (<i>Corydora aeneus</i>)	0.4 – 0.6	0,425	$y = 5,1361x + 6,9041$	1,00	48 horas

En la Tabla N°1, se determinó que el rango de dosis letal media del sulfato de cobre fue entre 0,1 y 1,5 mg·L⁻¹.

Asimismo, se determinó por análisis del Probit que el CL50 final fue de 0,417 mg·L⁻¹,120h para el Neón tetra (*Paracheirodon innesi*); 1,116 mg·L⁻¹,96h para el pez Dorado (*Carassius auratus*); 1,258 mg·L⁻¹,96h para el pez Guppy (*Poecilia reticulata*); 0,575 mg·L⁻¹,48h para el Otocinclus (*Otocinclus macrospilus*); 0,116 mg·L⁻¹,120h para el Barbo Sumatran (*Puntius tetrazona*); 0,919 mg·L⁻¹,120h para el pez Molly (*Poecilia sphenops*); 0,457 mg·L⁻¹,24h para el pez Monji-

ta (*Gymnocorymbus ternetzi*); 1,048 mg·L⁻¹,72h para el pez Espada (*Xiphophorus helleri*); 1,563 mg·L⁻¹,48h para el pez Platy (*Xiphophorus maculatus*) y 0,425 mg·L⁻¹,72h para la Coridora (*Corydora aeneus*).

Todos tuvieron coeficientes de correlación superior al valor de 0,89. Lo cual indica que la concentración del sulfato de cobre pentahidratado influye en no menos del 89% del CL50 de la mortalidad de las diez especies ictícolas expuestas (Figura N°3).



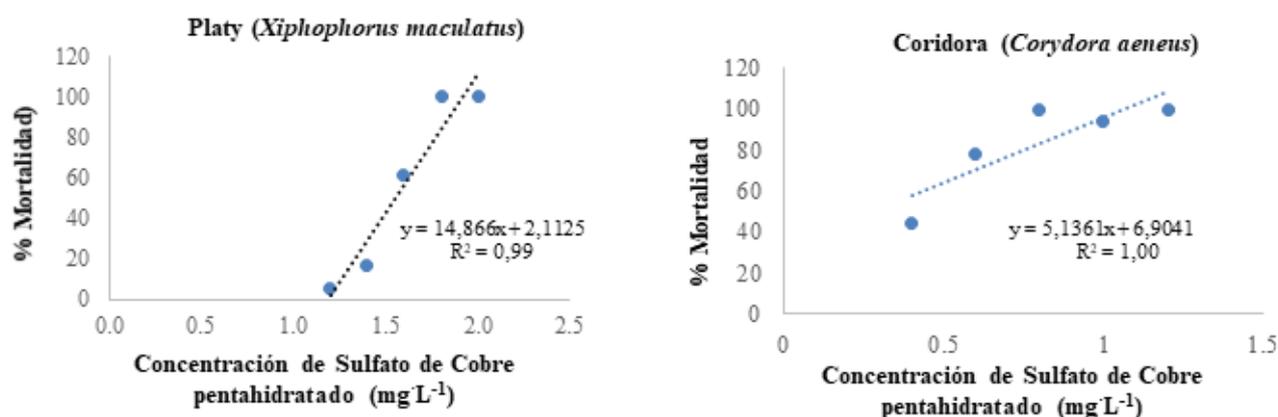


Figura N°3. Regresión lineal para el determinar el CL50 del sulfato de cobre pentahidratado sobre los peces dulceacuícolas evaluados.

DISCUSION

En la presente investigación se demostró que concentraciones inferiores a 0,5 o 0,75 mg·L⁻¹ fueron suficientes para matar a la mitad de la población existente en un plazo corto de 24 a 48 horas de exposición. Estos fueron los casos de tres peces amazónicos como el Otocinclus (*O. macrospilus*) con 0,575 mg·L⁻¹. El pez Coridora (*C. aeneus*) con 0,425 mg·L⁻¹, ambos a las 48 horas de exposición. Y el pez Neón tetra (*P.innesi*) con 0,417 mg·L⁻¹ a las 120 horas. Adicionalmente, el pez asiático no amazónico el Barbo Sumatran (*P. tetrazona*) tuvo un CL50 de 0,116 mg·L⁻¹ a las 72 horas de exposición.

Por otro lado, se está volviendo una tendencia muy común obtener el CL50 del sulfato de cobre pentahidratado y de otras sustancias químicas de peces de acuario principalmente de las Familias Poeciliidae y Cyprinidae. Sin embargo, los CL50 de todos ellos tuvieron valores por encima de 1 mg·L⁻¹. Así, el pez Dorado (*C. auratus*) tuvo un valor de CL50-96h de 1,116 mg·L⁻¹; el pez Guppy (*Poecilia reticulata*) un CL50-96h de 1,258 mg·L⁻¹; el pez Molly (*Poecilia sphenops*) un CL50-120h de 0,919 mg·L⁻¹; el pez Espada (*Xiphophorus helleri*) un CL50-72h de 1,048 mg·L⁻¹; y el pez Platy (*Xiphophorus maculatus*) un CL50-72h de 1,563 mg·L⁻¹. Además, todos tuvieron tiempos

de exposición por arriba de las 72 horas. Se ha reportado que casi todos los peces pueden tolerar dosis de unos 0,5 mg·L⁻¹ y prácticamente no se afecta a ninguno con 0,3 mg·L⁻¹ (6). Noga (28) recomienda que para evitar efectos tóxicos, la dosis debe ser inferior a 0,75 mg·L⁻¹. Estos resultados comparativos son importantes debido a que las especies amazónicas en especial las nativas poseen una “mayor sensibilidad”. Puesto que evidencian una menor concentración y un menor tiempo de exposición en comparación con otras especies que son más comerciales. Pero que podrían no ser los bioindicadores óptimos y no evidenciarían realmente los posibles daños a la ictiofauna local.

En conclusión, para la evaluación real del potencial efecto negativo del sulfato del cobre pentahidratado sobre los ambientes acuáticos locales se recomienda utilizar como un “bioindicador acuático” a especies ictícolas autóctonas y no especies introducidas ajenas a los nichos ecológicos peruanos amazónicos o andinos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Iannacone, J., Onofre, R., & Huanqui, O. 2007. Efectos ecotoxicológicos del Cartap sobre *Poecilia reticulata* “Guppy” (Poeciliidae) y *Paracheirodon innesi* “Neón tetra” (Characidae). *Gayana* 71(2): 170-177.

2. Martínez, F. & Espinosa, F. 2008. Ensayo de toxicidad aguda con larvas y juveniles de los peces *Brachydanio rerio* y *Poecilia reticulata*. URL: <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones2/libros/573/cap8.pdf>
3. Teesdale, C., Hadman, D. & NguriathI, N. 1961. El uso de sulfato de cobre de baja dosis continua como molusquicida en un sistema de riego en Kenia. *Bull World Health Organ* 25(4-5): 563-571.
4. Mendoza, R. 2009. Toxicidad aguda del sulfato de cobre en postlarvas de camarón. *Cryphiops caementarius*. *Archivos de Zootecnia* 58(221):103-110.
5. Matsuo, A., Wood, C. & Val, A. 2005. Effects of copper and cadmium on transport and gill metal binding in the Amazonian teleost tambaqui (*Colossoma macropomum*) in extremely soft water. *Aquatic Toxicology* 74: 351-364.
6. Romero, Byron. 2014. Determinación de la concentración letal media (CL50) producida por sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) en alevines de tilapia roja (*Oreochromis sp.*). Tesis para optar el título de Ingeniero Acuicultor. Universidad Técnica de Machala, Machala, Ecuador.
7. Velasco-Santamaría, Y., Gómez-Manrique, W. & Calderón-Bernal, J. 2006. Toxicidad aguda del sulfato de cobre (CuSO_4) en alevinos de Cachama blanca (*Piaractus brachipomus*) bajo condiciones de aguas blandas. *Orinoquia* 10(1): 64-70.
8. Atencio, William. 2013. Determinación de la concentración letal media (CL50-96) y efecto histopatológico del sulfato de cobre mediante bioensayos con alevinos del Carachi amarillo (*Orestias luteus*). Tesis para optar el título de Biólogo Microbiólogo. Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann. Lima. Perú.
9. Valverde, Eskim. 2015. Bioensayo agudo con sulfato de cobre en alevinos de Carpa *Cyprinus carpio* (Linnaeus, 1758) y su posible impacto debido a la actividad minera. Tesis de Magíster. Universidad Nacional de Ingeniería. Lima, Perú.
10. Park, K. & Heo, G. 2008. Acute and subacute toxicity of copper sulfate pentahydrate ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) in the Guppy (*Poecilia reticulata*). *Toxicology. Journal of Veterinary Medical Science* 71(3): 333-336.
11. Scotto, C., Arrilucea, M., Vargas, G., Salas, J. & Ybañez, J. 2016. Implementación de una metodología toxicológica para la rápida determinación del CL50 del sulfato de cobre en peces Cebra (*Danio rerio*) a 24, 48, 72, 96 y 120 horas de exposición. *Revista Cátedra Villarreal* 4(2): 183-188.
12. Barreto, J. & Peralta, G. 2009. Determinación de la concentración letal media (CL50-96) del cobre (Cu) y zinc (Zn) mediante pruebas toxicológicas (Bioensayos), utilizando alevinos de *Oncorhynchus mykiss* (Trucha Arco Iris). Tesis de grado para optar al título de ingeniero ambiental y sanitario. Universidad de la Salle. Bogotá. Colombia.
13. Kirici, M., Turk, C. & Caglayan, C. 2017. Toxic effects of copper sulphate pentahydrate on antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation of freshwater fish *Capoeta umbla* (Heckel, 1843) tissues. *Applied Ecology and Environmental Research*. 15(3): 1685-1696.
14. INSTITUTO DE INVESTIGACIONES DE LA AMAZONÍA PERUANA (IIAP). 2011. Peces ornamentales amazónicos. Catálogo 2011. 72 pp. Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana- IIAP. [acceso: 20/5/2019]. Disponible en: http://repositorio.iiap.org.pe/bitstream/IIAP/138/1/sanchez_libros_2011.pdf
15. Ortega, H., Hidalgo, M., Trevejo, G., Correa, E., Cortijo, A., Meza, V. & Espino, J. 2012. Lista anotada de los peces de aguas continentales del Perú: Estado actual del conocimiento, distribución, usos y aspectos de conservación. Ministerio del Ambiente, Dirección General de Diversidad Biológica Eds. Museo de Historia Natural de la UNMSM. 2da. ed. Lima, Perú.
16. Zafra, A.; Díaz, M.; Dávila, F.; Vela, K. & Colchado, J. 2018. Catálogo de peces ornamentales en Trujillo, La Libertad, Perú. *Arnaldoa* 25(2): 757-786.
17. Herbert R, Dauner E. 2002. Enciclopedia de peces de acuario de agua dulce. España: Hispano Europea. 1010 p.
18. CABI. 2013. *Carassius auratus auratus* (Goldfish) [Bonham, V.] En: *Invasive Species Compendium*. Wallingford, UK: CAB International. URL: <http://www.cabi.org/isc/datasheet/90564>
19. Hidalgo, M. 1990. Como obtener guppys de calidad. *Chalwa* 3: 15-21.
20. Villamil, L. & Castellanos, J. 2011. Fecundidad de *Otocinclus spectabilis*. *Orinoquia* 15(1): 41-47.
21. Nico, L. Schofield, P., Neilson, M. & Loftus, B. 2019. *Poecilia sphenops Valenciennes* in Cuvier and Valenciennes, 1846: U.S. Geological Survey, Nonindigenous Aquatic Species Database, Gainesville, FL. URL: <https://nas.er.usgs.gov/queries/Fac tSheet.aspx?speciesID=864>
22. Eschmeyer, W. N. (ed). *Catalog of Fishes: Genera, Species, References*. URL: <http://research.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp>
23. Kallman, K.D. The platyfish, *Xiphophorus maculatus*. 1975. In *Handbook of Genetics*, Volume 4. King RC (ed), Plenum Publishing Corporation, New York. 81-132.

24. Elson, G. & Oliver Lucanus, O. (2003). Catfish: Everything About Natural History, Purchase, Health Care and Breeding. URL: https://sta.uwi.edu/fst/lifesciences/sites/default/files/lifesciences/documents/ogatt/Corydoras_aeneus%20-%20Bronze%20Corydoras.pdf

25. NORMA TÉCNICA PERUANA 311.328. 1997. (Revisada el año 2018). Sulfato de cobre para tratamiento de agua. Requisitos. 1era. edición. Reemplaza a la NTP 311.328 del año 1997. Resolución Directoral N° 023-2018-INACAL/DN. Diario Oficial El Peruano, pp. 31. (3 de setiembre de 2018). URL: <https://www.inacal.gob.pe/repositorioaps/data/1/1/6/jer/resoluciones-directorales/files/2018-RD23.pdf>

26. Rusel, W. M. S & Burch, R. L. 1959. The principles of Humane Experimental Technique. London, UK: Methuen.

27. Finney, D. & Stevens, W. 1948. A table for the calculation of working probits and weights in probit analysis. *Biometrika* 35(1-2): 191-201.

28. Noga, Edward. 1996. Fish diseases, diagnosis and treatment. St. Louis, Missouri: Mosby-Year Book, Inc. 2nd. edition. Iowa State University. Iowa. USA.