



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA
ESCUELA DE POSGRADO VICTOR ALZAMORA CASTRO

**"CALIDAD DE AGUA,
BIOACUMULACIÓN DE METALES
PESADOS Y NIVELES DE ESTRÉS EN
LA TRUCHA ARCOÍRIS (*Oncorhynchus
mykiss*) EN CHALLHUAHUACHO,
APURÍMAC"**

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE
MAESTRO EN SANIDAD ACUÍCOLA

SAMANTA ZEVALLOS DE LA TORRE

Lima – Perú

2018

Asesor de Tesis:

Nino Dante Arias Cruz M.V., Dr.med.vet., M.Sc.

Agradecimientos:

La realización de esta tesis para optar el grado de Magister en Sanidad Acuícola ha sido posible gracias al apoyo financiero brindado al Programa de Maestría en Sanidad Acuícola de la UPCH subvencionado por Cienciactiva del CONCYTEC (Convenio de Gestión N° 230-2015 FONDECYT).

A mi asesor de tesis, Dr. Nino Arias, quien con sus conocimientos, experiencia, paciencia y motivación ha logrado en mí que pueda terminar la tesis con éxito.

A la Dra. Iskra Tuero, por sus apreciados y relevantes aportes, críticas, comentarios y sugerencias durante el desarrollo de esta investigación.

A la Municipalidad de Challhuahuacho, que brindó todas las facilidades y puso sus recursos a disposición de este proyecto.

A la Comisaría de Challhuahuacho, por su apoyo en garantizar la seguridad del trabajo de campo.

RESUMEN

En los últimos años los pescadores del distrito de Challhuahuacho, Departamento de Apurímac, han manifestado observar una significativa disminución en la cantidad de truchas arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) en relación a años anteriores. Los pobladores se encuentran preocupados por la posible contaminación que pueda generar los residuos de la actividad minera del proyecto Las Bambas en el río Challhuahuacho. El objetivo del estudio fue analizar el agua del río Challhuahuacho, la concentración de metales pesados en el músculo de las truchas arcoíris y la relación de estos con sus niveles de estrés. Para ello fueron considerados 4 puntos de monitoreo, se tomaron muestras de agua para analizar parámetros fisicoquímicos como pH, temperatura, oxígeno disuelto, conductividad, aceites y grasas, demanda bioquímica de oxígeno, fósforo total, sulfuro, amoníaco, nitrato, cromo IV; metales pesados tales como Sb, As, Ba, Cd, Cu, Hg, Ni, Pb, Se, Tl y Zn; y coliformes totales. Se tomaron muestras de músculo de truchas arcoíris de los 4 puntos para determinar la concentración de metales pesados tales como As, Cd, Hg y Pb, y finalmente se tomaron muestras de sangre de estos animales para determinar la concentración de cortisol plasmático. El análisis de agua, analizado en el laboratorio SGS de Lima, demostró que los parámetros fisicoquímicos, las concentraciones de coliformes termotolerantes, y las concentraciones de metales pesados en agua del río Challhuahuacho no presentan un riesgo para el equilibrio del ecosistema acuático. En un total de 37

ejemplares capturados de trucha arcoíris, las concentraciones de metales pesados en el músculo de las truchas se encontraron por debajo de los Contenidos Máximos Permitidos, por lo que se considera que este indicador no presenta un riesgo para la salud humana. La prueba de ELISA para cortisol plasmático, analizada en el laboratorio de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, mostró bajos niveles de estrés en las truchas arcoíris.

Palabras clave: Trucha arcoíris; Challhuahuacho; calidad de agua; metales pesados; cortisol plasmático.

ABSTRACT

In recent years, fishermen from the district of Challhuahuacho, Apurímac, have seen a significant decrease in the number of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in relation to previous years. The people is concerned about the possible contamination that may be generated by the mining activity from "Las Bambas" project in Challhuahuacho River. The objective of the study was to analyze the water quality of the Challhuahuacho river, the concentration of heavy metals in the muscle of the rainbow trout and the relationship of those with stress levels. For the study, four monitoring geographical points were considered. Water samples were taken to analyze physicochemical parameters such as pH, temperature dissolved oxygen, conductivity , olis and fats, biochemical oxygen demand, total phosphorus, sulfur, ammonia, nitrate chromium IV; heavy metal such as Sb, As, Ba, Cd, Cu, Hg, Ni, Pb, Se, Ti and Zn; and total coliforms. Samples of rainbow trout muscle were taken for the four point in order to determine the concentration of heavy metals such as As, Cd, Hg and Pb. Finally blood samples were taken from these animals to determine the concentration of plasmatic cortisol. The water was analyzed in the SGS Labs in Lima, the results showed that the physicochemical parameters, the concentrations of thermotolerant coliforms, and the concentrations of heavy metals in Challhuahuacho river water do not show a risk for the balance of the aquatic ecosystem. Then, in 37 captured rainbow trout, concentrations of heavy metals in those trout muscle were found below the Maximum Allowed Contents, reason why

it is considered that this indicator does not present a risk to human health. The ELISA test for plasmatic cortisol, analyzed in the laboratory of the Universidad Peruana Cayetano Heredia, showed low levels of stress in rainbow trout.

Keywords: Rainbow trout; Challhuahuacho; water quality; heavy metals; plasma cortisol.

Tabla de contenidos

LISTA DE TABLAS		
LISTA DE FIGURAS		
RESUMEN		
ABSTRACT		
I	INTRODUCCIÓN	1
II	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	4
III	MARCO TEÓRICO	5
IV	JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO	10
V	OBJETIVOS	11
VI	METODOLOGÍA	12
	6.1 LUGAR DE ESTUDIO	12
	6.2 POBLACIÓN Y MUESTRA	14
	6.3 MUESTREO DE AGUA	14
	6.4 MUESTREO DE TRUCHA ARCOÍRIS	16
	6.4.1 VALIDACION DEL KIT DE ELISA	16
	6.4.2 MUESTREO DE SANGRE	16
	6.4.3 MUESTREO DE MÚSCULO	18
	6.5 ENSAYO DE ELISA	18
	6.6 ANALISIS DE DATOS	20
VII	RESULTADOS	21
	7.1 ANÁLISIS DE AGUA	21

7.1.1	FISICOQUÍMICOS	21
7.1.2	COLIFORMES TERMOTOLERANTES	22
7.1.3	METALES PESADOS	22
7.2	ANÁLISIS EN TRUCHA ARCOÍRIS	23
7.2.1	MEDIDAS BIOMÉTRICAS	23
7.2.2	METALES PESADOS EN MÚSCULO	24
7.2.3	CORTISOL PLASMÁTICO	25
VIII	DISCUSIÓN	27
IX	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	36
X	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37
XI	ANEXOS	50

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Resultados del análisis de los parámetros fisicoquímicos en el agua.

Tabla 2. Resultados del análisis de coliformes termotolerantes en el agua

Tabla 3. Resultados del análisis de metales pesados en el agua

Tabla 4. Número de peces colectados y promedios de talla y peso por zona.

Tabla 5. Resultados del análisis de bioacumulación de metales pesados en músculo de trucha arcoíris (mg/kg).

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa de puntos de monitoreo en Challhuahuacho, Apurímac, Perú.

Figura 2. Toma de muestras de sangre en trucha arcoíris.

Figura 3. Concentraciones de cortisol plasmáticos después de la aplicación de ACTH.

Figura 4. Curva estándar para la determinación de cortisol utilizando la concentración estándar (ng/ml) y el porcentaje de unión máxima de absorbancia.

I. INTRODUCCIÓN

En la Región Apurímac, la actividad pesquera y acuícola se ha venido desarrollando debido a que cuenta con gran potencial hídrico e hidrobiológico. De acuerdo al inventario del Ministerio de la Producción (PRODUCE), la región cuenta con 317 lagunas, 78 lagunillas, 119 ríos y 443 riachuelos. La actividad extractiva en la región está basada en la pesca de trucha en los ríos y suele desarrollarse sin mayor conocimiento de extracción, utilizando métodos inadecuados y obteniendo bajos volúmenes de captura (Gobierno Regional de Apurímac, 2010). Sin embargo, según las cifras de la Dirección Regional de la Producción (DIREPRO), la producción anual de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) ha ido decreciendo en los últimos años (Gobierno Regional de Apurímac, 2010). En una evaluación epidemiológica del 2010, los pescadores manifestaron observar una disminución significativa en la cantidad de truchas capturadas de los ríos en relación a años anteriores (MINSA, 2010). Los pobladores se encuentran preocupados por la contaminación de sus recursos hídricos ya que a estos llegan los residuos de la actividad minera en la zona, razón por la cual, se han presentado numerosos conflictos sociales en los últimos años (La República, 7 de noviembre de 2015).

El proyecto minero Las Bambas es el más grande del Perú y explota cobre, molibdeno y oro. Se ubica en los distritos de Challhuahuacho y Progreso en

Apurímac, (Las Bambas, 2017). La región es de gran potencial minero (Herrera *et al*, 2006). Sin embargo, se sabe que el exceso de minerales tóxicos y la producción de ácidos provenientes de rocas mineralizadas y desechos mineros tienen la capacidad de deteriorar la calidad de agua, especialmente de los ríos. En los peces, la exposición crónica a estos contaminantes afecta su respuesta inmune (Nakano *et al.*, 2015), por lo cual, es posible que los reportes de una disminución en los volúmenes de extracción en la zona de influencia minera estén relacionados a la calidad del ecosistema.

El presente estudio busca evaluar la calidad química y microbiológica del agua del río Challhuahuacho en las zonas donde se realiza actividad pesquera. Se realizó un análisis fisicoquímico del agua midiendo parámetros como potencial de hidrogeno (pH), temperatura, oxígeno disuelto, conductividad, aceites y grasas, demanda bioquímica de oxígeno (DBO), fósforo total, sulfuro, amoníaco, nitrato, cromo IV; un análisis de metales pesados tales como antimonio (Sb), arsénico (As), bario (Ba), cadmio (Cd), cobre (Cu), mercurio (Hg), níquel (Ni), plomo (Pb), selenio (Se), talio (Tl) y zinc (Zn); y un análisis microbiológico donde se procedió al recuento de coliformes totales. Se comparan los resultados obtenidos con los Estándares Nacionales de Calidad Ambiental (ECAs) para agua, aprobados en el Decreto Supremo N° 015-2015-MINAM. El estudio también determina la concentración de metales pesados en el músculo de las truchas arcoíris, tales como arsénico (As), cadmio (Cd), mercurio (Hg) y plomo

(Pb) y los compara con los Contenidos Máximos Permitidos dispuestos por SANIPES (SANIPES, 2016).para agua con el fin de precisar si es un recurso inocuo y apto para el consumo humano. Asimismo, para evaluar la manera en cómo afectan estas variables a los peces el estudio mide los valores de cortisol sérico en las truchas y los utiliza como indicador de respuesta a los estresores de su medio acuático. Los resultados obtenidos en este estudio contribuirán al conocimiento y a la toma de acciones que mitiguen los posibles contaminantes del río.

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Debido a la constante intranquilidad social de los pobladores del Distrito de Challhuahuacho por la disminución de sus recursos pesqueros, el presente trabajo busca determinar si hay una posible contaminación del río por metales pesados y si estos se están bioacumulando en el músculo de las truchas. De ser así, el producto pesquero podría no ser inocuo ni apto para su consumo y deberán tomarse medidas para identificar y remediar el origen de la contaminación, y para detener inmediatamente su pesca, comercialización y consumo. Como aporte adicional, el estudio realizará muestreos sanguíneos en las truchas para determinar los niveles de cortisol plasmático, lo cual servirá para evaluar si los peces están teniendo una respuesta frente a los posibles estresores de su medio acuático, lo cual ayudará a corroborar los resultados del análisis de metales pesados o abrirá la puerta a replantearse otros posibles estresores. De esta manera, se busca que los resultados obtenidos puedan ser utilizados para realizar posibles relaciones de causa y efecto. Las conclusiones de la investigación serán presentadas ante la Municipalidad de Challhuahuacho como un aporte científico a su programa de gestión ambiental.

III. MARCO TEÓRICO

A nivel mundial, las perturbaciones debidas a los contaminantes acuáticos se han convertido en un problema grave (Hofmann & Todgham, 2010). Patógenos, metales pesados y toxinas son los aspectos más importantes a considerar (Madera, 2006). La exposición a contaminantes ambientales puede conducir a inmunosupresión y aumento de la susceptibilidad a enfermedades en los salmónidos y otros peces (Arkoosh *et al.*, 1998). Contaminantes tóxicos, cambios agudos de temperatura, calidad de agua, pueden aumentar las posibilidades de que estos peces sucumban a enfermedades infecciosas (Nakano, 2011; Pankhurst, 2011; Ellis *et al.*, 2012; Nakano *et al.*, 2015).

Los desarrollos industriales intensivos en las últimas décadas han aumentado la concentración de metales pesados en los ecosistemas acuáticos, afectando a los peces y especies que viven en ellos (Kumar & Nandan, 2014). El proyecto minero Las Bambas, tiene una influencia socio-ambiental sobre los distritos de Challhuahuacho, Progreso y Huaquirá. El proyecto minero posee un gran potencial polimetálico, principalmente de cobre y oro, pero su explotación puede generar también otros minerales como sílice, plomo, cobre, cadmio, mercurio, cianuro, arsénico, dióxido de azufre y óxidos de nitrógeno (Astete *et al.*, 2014). Estos metales y compuestos tienen conocidos efectos dañinos para la salud del hombre, tales como lesiones a la piel, músculos y huesos, daños en el sistema nervioso central, cardiovascular, respiratorio y digestivo, trastornos del comportamiento, cáncer, entre otros (CooperAcción, 2016).

Los contaminantes como metales pesados son especialmente preocupantes en los ecosistemas acuáticos debido a su toxicidad y capacidad de bioacumulación (Rose *et al.*, 1999). Estos deterioran la calidad de vida del agua, causan daños tanto a la flora como a la fauna y son considerados como la principal causa de contaminación acuática (Abdel-Meguid *et al.*, 2002). Según los pobladores de Challhuahuacho, el movimiento de tierras en el proceso de construcción en la zona de Chuspiri ha producido la extinción de truchas en el río, y con ello, la actividad pesquera como fuente de ingresos (PRODUCE, 2010).

Por otro lado, el distrito de Challhuahuacho, también enfrenta otro problema de contaminación de sus recursos hídricos. Los pobladores del distrito también han manifestado su preocupación por la contaminación que genera, en el río del mismo nombre, el vertimiento de las aguas servidas y residuos sólidos de su mismo distrito (OEFA, 2014). La autoridad Nacional del Agua (ANA) ha confirmado la existencia de 13 vertimientos directos de aguas residuales municipales en el río Challhuahuacho sin autorización. Estos vertimientos pueden considerarse un factor de contaminación grave hacia los recursos acuáticos. En América latina, el 70% de las aguas residuales no son tratadas. El agua es extraída, usada y devuelta completamente contaminada a los ríos. (Yee-Batista, 2013). De igual manera, en el Perú, el 70% de las aguas residuales en el Perú no tienen tratamiento de aguas alguno (SUNASS, 2008). El alto riesgo que representa para la población se debe a la pobre calidad microbiológica del agua y

porque menos del 50% de los sistemas de potabilización en la región aplican la desinfección (Madera, 2006). El primer impacto de las descargas de aguas servidas domésticas sin tratar en los cuerpos de aguas receptores es el deterioro de la calidad del agua. Esto es debido al aumento de materia orgánica, demanda bioquímica de oxígeno (DBO), sólidos, nutrientes (fósforo, nitrógeno), y bacterias coliformes, lo que puede conducir a la eutrofización del sistema de agua (Vollenweider, 1968). Por ello, frecuentemente las normas sobre la calidad de las aguas residuales se expresan según el número máximo permisible de bacterias coliformes fecales o totales (Leon, 1995).

Como consecuencia de las condiciones ambientales estresantes mencionadas, los peces poseen un amplio rango de respuestas conocidas como la respuesta al estrés generalizado (Beitinger & McCauley, 1990; Wendelaar, 1997; Barton, 2011). Las respuestas incluyen una serie de cambios bioquímicos y fisiológicos tanto a nivel celular como a nivel de organismo. Si bien son un mecanismo de defensa, las respuestas de estrés en los peces pueden afectar su salud general, resistencia a la enfermedad, crecimiento y reproducción (Nakano, 2011; Nakano *et al.*, 2015).

La respuesta primaria al estrés conlleva la activación de centros nerviosos, particularmente localizados en el área preóptica y el hipotálamo, tras la percepción del estrés a través de los sistemas sensoriales. Esto resulta en una rápida activación del sistema nervioso simpático, cuyas neuronas inervan el tejido cromafín a través de receptores colinérgicos (Reid *et al.*, 1996). Esta vía neuroendocrina, denominada eje

hipotalámico-simpático-cromafín (HPC) es responsable de la liberación inmediata y masiva de catecolaminas (adrenalina, noradrenalina y, en menor medida, dopamina) a la sangre en una situación de estrés (Gesto *et al.*, 2013).

Al mismo tiempo, aunque de forma más lenta, se produce la activación de otra vía mediada por el denominado eje hipotalámico-hipofisario-interrenal o HPI. A diferencia de los mamíferos donde el conjunto de órganos implicados en la respuesta ante situaciones de estrés se denomina eje HPA (eje hipotálamo-pituitaria-adrenal), en los peces, el conjunto de órganos que responden ante el estrés es denominado HPI. Esto es debido a que no poseen una glándula adrenal compacta, sino un conjunto difuso de células interrenales embutidas en la porción anterior del riñón (Barandica & Tort Bardolet, 2010).

En el eje HPI actúan neurotransmisores como la serotonina, la dopamina o la noradrenalina, y también neurohormonas. De estas últimas destaca la hormona o factor liberador de corticotropina (CRF), que actúa sobre la hipófisis anterior estimulando la secreción de la hormona adrenocorticotropa (ACTH), a la sangre (Gesto *et al.*, 2013). La ACTH actúa sobre el tejido interrenal y así promueve la liberación de cortisol al torrente sanguíneo. Unos niveles elevados de catecolaminas y cortisol en la circulación son considerados como típicos representantes de la respuesta primaria al estrés. Usados para preparar al animal para una posible huida, enfrentamiento o cualquier reacción para evadir o reducir el efecto del agente estresor. (Gesto *et al.*, 2013)

En salmónidos no estresados, los niveles fisiológicamente relevantes de la hormona del estrés, cortisol, varían entre 0 a 82 ng ml⁻¹, y ante la presencia de un factor de estrés agudo el cortisol plasmático suele elevarse típicamente a niveles de 40 a 250 ng ml⁻¹ (Skinner *et al.*, 2010). La liberación de cortisol, a su vez, tiene efectos tóxicos indirectos sobre las branquias, como la alteración del balance hidromineral debido al aumento de la perfusión de las branquias y de la permeabilidad de las vías celulares y/o paracelulares (Wendelaar, 1996). Otras respuestas celulares al estrés incluyen el aumento de la producción de proteínas de choque térmico o proteínas de estrés (HSP). Entre éstos, las proteínas de choque térmico de 70 KDa (HSP70) tienen un componente fuertemente inducible influenciado por distintos factores estresantes ambientales, tales como temperatura, metales pesados, contaminantes orgánicos, luz ultravioleta o campos magnéticos (Lewis *et al.*, 1999).

Una de las técnicas más adecuadas para medir los niveles de cortisol, debido a su elevada sensibilidad y especificidad, es el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) (Tintos *et al.*, 2006). Esta técnica no requiere conocimientos técnicos avanzados, instrumentación costosa, ni necesita radioisótopos (Barry *et al.*, 1993). Por ello, distintos autores han utilizado con éxito el ensayo de ELISA para medir el cortisol plasmático en salmónidos (Ackerman & Iwama, 2001; Farrell *et al.*, 2001; Afonso *et al.*, 2003; Tintos *et al.*, 2006; Santamaría & Casallas, 2007; Fast *et al.*, 2008; Skinner *et al.*, 2010).

IV. JUSTIFICACION DEL ESTUDIO

La pesca a pequeña escala es una actividad que contribuye a disminuir la pobreza y a aumentar la seguridad alimentaria en el país. Especies como la trucha arcoíris han permitido el desarrollo de la pesca en varias regiones de la sierra del país. Algunas comunidades pesqueras suelen enfrentar una serie de problemas graves, entre los que figura el agotamiento de los recursos por la contaminación, la degradación ambiental, entre otros. En el distrito de Challhuahuacho, departamento de Apurímac, los pobladores indican que las poblaciones de trucha arcoíris en la zona han disminuido en los últimos años debido a la alteración de sus hábitats como consecuencia de las actividades mineras adyacentes. La falta de información científica respecto al comportamiento de la especie en este lugar y del tamaño de su población en años anteriores, limita a las autoridades del sector a tomar acciones frente a esta problemática. Por ello, el presente estudio busca determinar la calidad de agua del río Challhuahuacho y si sus parámetros tienen un efecto sobre los niveles de estrés en las truchas arcoíris. Los resultados aportarán información científica que podrá ser de apoyo en la toma de decisiones sobre el manejo ambiental del distrito.

V. OBJETIVOS

Objetivo general:

Determinar la calidad de agua del río Challhuahuacho y su relación con los niveles de estrés en truchas arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*).

Objetivos específicos:

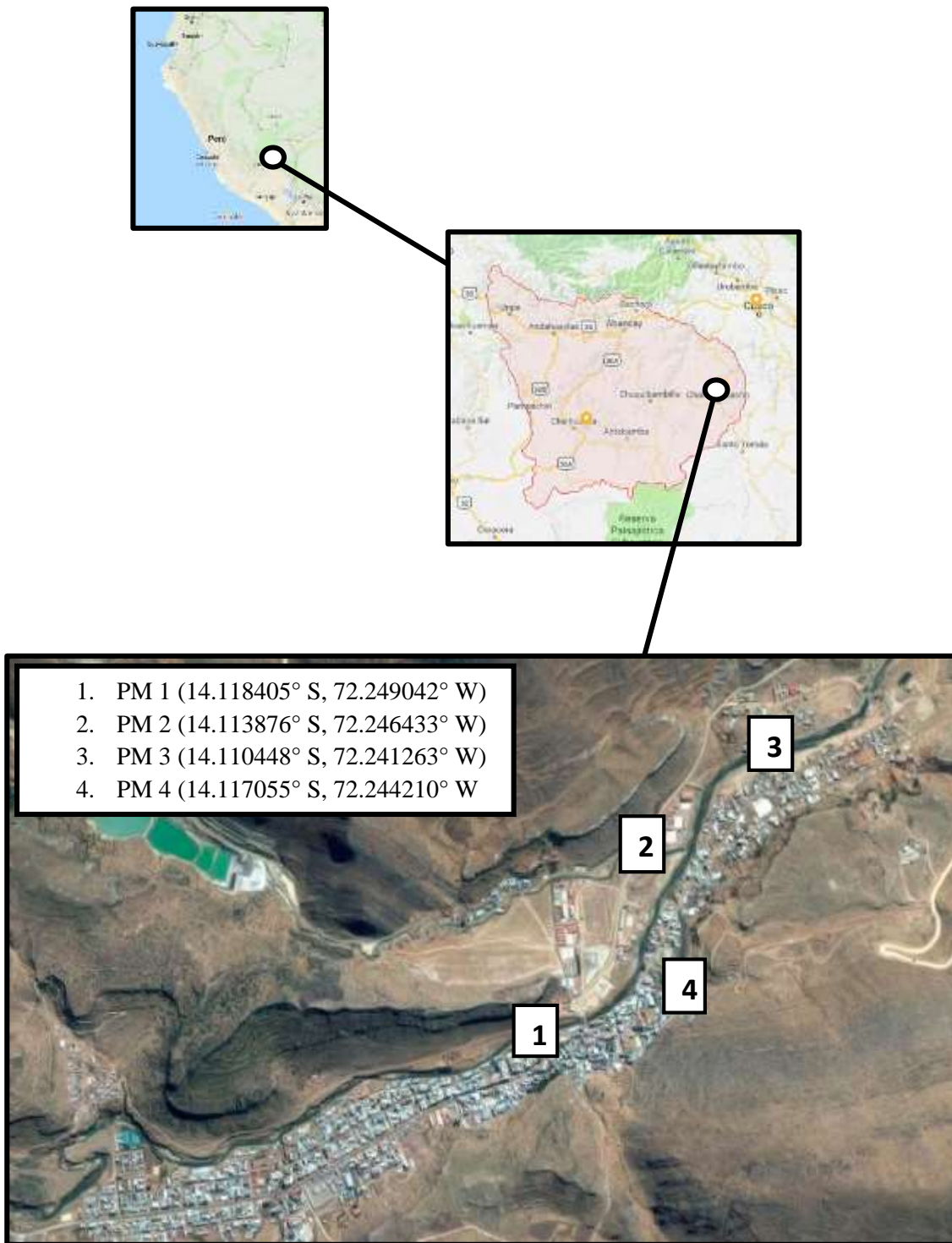
- Medir los parámetros físico-químicos, inorgánicos y microbiológicos en muestras de agua del río Challhuahuacho.
- Determinar la concentración de metales pesados en el músculo de las truchas arcoíris del río Challhuahuacho.
- Medir los niveles de cortisol plasmático en las truchas del río Challhuahuacho.

VI. METODOLOGÍA

6.1 Lugar de estudio

La muestra representativa fue obtenida del río Challhuahuacho, en la provincia de Cotabambas, departamento de Abancay, durante la temporada de lluvias en 2017. Se consideraron 4 puntos de monitoreo (PM) para la toma de muestras de agua y de truchas arcoíris (Figura 1). El PM 1 (14.118405° S, 72.249042° W) fue en el río Challhuahuacho frente al centro del distrito del mismo nombre, el PM 2 (14.113876° S, 72.246433° W) fue en un afluente del río con aguas provenientes de la minera Las Bambas, el PM 3 (14.110448° S, 72.241263° W) fue en el río Challhuahuacho aguas abajo, y el PM 4 (14.117055° S, 72.244210° W) fue en aguas del manante Chalhuapuquio que nutren al río Challhuahuacho.

Figura 1. Mapa de puntos de monitoreo en Challhuahuacho, Apurímac, Perú.



6.2 Población y muestra

La población objetivo fue la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) del río Challhuahucho. Se realizó una colecta activa por unidad de esfuerzo, considerando 10 lances de la atarraya por punto de muestreo. Fueron programados 4 días consecutivos por la mañana (07:00) para cubrir los 4 puntos de muestreo. La investigación se limitó a la obtención de truchas que presenten un mínimo de 15 cm de longitud y 200 g de peso (el volumen sanguíneo total es el 5% del peso vivo).

6.3 Muestreo de agua

Las muestras de agua fueron tomadas en los puntos de muestreo 1, 2 y 3. Para el análisis del PM 4 se utilizaron los resultados obtenidos de los informes técnicos del Gobierno Regional de Apurímac de mayo de 2016 (Gobierno Regional de Apurímac, 2016). El muestreo de campo se realizó siguiendo los procedimientos establecidos por el Protocolo Nacional de Monitoreo de la Calidad de los Recursos Hídricos Superficiales de la Autoridad Nacional del Agua (ANA) con Resolución Jefatural N°010-2016-ANA. Se tomaron las medidas de protección recomendadas, utilizando botas de jebe y guantes descartables antes del inicio de la toma de muestras. Las muestras fueron tomadas en un punto de fácil acceso, donde la corriente era homogénea, evitando aguas estancadas. Los siguientes

parámetros fueron medidos directamente del río utilizando un equipo multiparamétrico con sondas calibradas (Hach, HQ40d, USA): potencial de hidrógeno (pH), temperatura, oxígeno disuelto y conductividad. Para las muestras que serían enviadas al laboratorio, el muestreo se realizó con recipientes estériles, retirando la tapa y contratapa sin tocar la superficie interna del frasco, cogiendo la botella por debajo del cuello, y finalmente, sumergiéndola en dirección opuesta al flujo de agua.

Para el análisis físicoquímico se tomaron muestras para evaluar los siguientes parámetros: aceites y grasas, DBO, fósforo total, nitratos y sulfuros. En el caso de aceites y grasas, la muestra fue tomada de la superficie del río. Para el análisis inorgánico se colectó muestras de agua para la medición de los siguientes parámetros: amoníaco, cromo IV y metales pesados. Para el análisis microbiológico se realizó una toma de muestra directa a una profundidad de 20 cm para la detección de coliformes termotolerantes (44.5°C). En este caso, se dejó un espacio del 10% del volumen del recipiente para asegurar un adecuado suministro de oxígeno para las bacterias.

Para las muestras que requirieron preservación, se consideró dejar un espacio de alrededor de 1% aproximadamente de la capacidad del envase. Estas muestras fueron preservadas inmediatamente después de la colecta según la metodología requerida por el laboratorio (Anexo 1). Una vez preservada cada muestra, se

homogenizó y se cerró herméticamente el recipiente. Los envases de mantuvieron en cadena de frío y fueron derivados al laboratorio SGS, en Lima, para su procesamiento. Los métodos de análisis para cada parámetro se detallan también en el anexo 1.

6.4 Muestreo en trucha arcoíris

6.4.1 Validación del kit de ELISA

Previo al muestreo del presente estudio, se tomaron truchas arcoíris para la validación del kit de ELISA (Neogen Corporation). Para ello, se muestreó 5 truchas arcoíris de la piscigranja Ingenio, en Huancayo, Departamento de Junín. Se tomó una muestra sanguínea basal a un animal y se prosiguió a inyectar a los demás peces con Synacthen (análogo de la hormona adrenocorticotropa (ACTH)) en la vena caudal para estimular la liberación de cortisol. Se tomaron muestras a los 15, 30, 45 y 60 min de la estimulación a los peces restantes. Se extrajo el de plasma de las muestras y se las mantuvo en cadena de frío hasta su traslado a la Universidad Peruana Cayetano Heredia. Los peces utilizados fueron puestos a disposición de la piscigranja.

6.4.2 Muestreo de sangre

La captura de los peces para los muestreos se realizó con una atarraya (malla

de pesca). Los peces capturados se colocaron en recipientes de 20 – 25 L y fueron anestesiados por inmersión en metasulfanato de tricafina (MS-222, INVE, Redmond, WA, EUA) disuelto en el agua (100 mg/L). Se tomaron datos biométricos de peso y talla. Se realizó la extracción de sangre por punción con una jeringa de 3 mL y una aguja de 21G o 23G en la zona ventral del tercio caudal del pedúnculo, extrayéndose desde la vena caudal no menos de 1 mL de sangre (Figura 2). Las muestras obtenidas fueron depositadas lentamente en tubos con anticoagulante (sin jeringa). Para la obtención del plasma se centrifugaron por 10 min a 3000 rpm. Luego por medio de una micropipeta se extrajo el plasma, el cual fue depositado en tubos Eppendorf de 1.5 mL y fueron mantenidos en cadena de frío hasta su traslado a los laboratorios de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.



Figura 2. Toma de muestras de sangre en trucha arcoíris.

6.4.3 Muestreo de músculo

Para el muestreo de músculo se utilizó a los peces anestesiados y se les dio muerte por decapitación. Cada individuo fue lavado con agua corriente y se lo colocó en una bandeja limpia. Para la preparación de la muestra se evisceró al pescado evitando que se contaminara el músculo con las vísceras. Se extrajo el músculo lateral axial y se tomó una muestra de 50 g por ejemplar. Se utilizó una cuchilla nueva para cada punto de monitoreo para evitar contaminación cruzada. En cada PM se realizó un pool con todas las muestras obtenidas, estas fueron depositadas en 4 bolsas Ziploc herméticas, y mantenidas en cadena de frío hasta su llegada al laboratorio. Las muestras fueron procesadas en el laboratorio SGS, en Lima, mediante el método de ensayo ENVIDIV-SGS-ME37: 2015 Rev.01 – Determinación de Metales en muestras Orgánicas por Espectrometría de Masas con flama de acoplamiento inductivo (ICP-MS) (U.S EPA, 2014).

6.5 Ensayo de ELISA

En el laboratorio, los niveles de cortisol sérico fueron determinados utilizando un kit comercial de ELISA de unión competitiva específica para cortisol (Neogen Corporation, Lexington, KY, USA) a partir de muestras duplicadas. Para la elaboración del siguiente protocolo se tomó como referencia los procedimientos

descritos por Santamaría y Casallas (2007) y las instrucciones del fabricante considerando los recursos disponibles.

Para la extracción del cortisol, se pipeteó 100 μ L de plasma en un tubo de vidrio y se agregó 1 mL de dietil éter. Se agitó el tubo por 30 s con un vórtex y se congeló por una hora para separar las fases. Se transfirió la fase orgánica en un tubo de vidrio y se dejó evaporar el solvente en la estufa. Se agregó 100 μ L de buffer de extracción diluido. Se diluyó el extracto 100 veces añadiendo 10 μ L del extracto anterior a 990 μ L de buffer de extracción diluido.

Para la realización del test de ELISA, se homogenizó el extracto con un vórtex y se colocó 50 μ L por pocillo. Los estándares fueron preparados según las indicaciones del fabricante. Se diluyó el conjugado de la enzima cortisol, agregando 110 μ L del conjugado enzimático en 5.5 mL de volumen total de Buffer EIA, se mezcló y se añadió 50 μ L del conjugado enzimático diluido a cada pocillo. Se mezcló agitando suavemente la placa. Se cubrió la placa con papel aluminio y se incubó a temperatura ambiente durante una hora. Después de la incubación, se vació el contenido de la placa en papel absorbente y se procedió a lavar cada pocillo con 300 μ L de Buffer de lavado diluido repitiendo 3 veces. Se añadió 150 μ L de sustrato a cada pocillo, se mezcló agitando suavemente la placa, y se dejó incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos.

Debido a que este kit funciona sobre la base de la competencia entre el conjugado

de enzima y el cortisol en la muestra para un número limitado de sitios de unión en la placa recubierta de anticuerpo, durante la incubación se da la competencia por los sitios de unión. De manera que al lavar la placa y eliminar el material no unido, el conjugado enzimático unido se detecta al adicionar el sustrato que genera color.

Luego de la incubación, se leyó la placa en un lector de microplacas a 620 nm. Los resultados de la prueba cuantitativa se obtuvieron midiendo y comparando la lectura de la absorbancia de los pocillos de las muestras con los estándares. El grado de desarrollo del color es inversamente proporcional a la cantidad de cortisol en la muestra o estándar.

6.6 Análisis de datos

Las medidas biométricas, como la longitud y el peso, se presentaron como promedio \pm desviación estándar por punto de monitoreo.

Se desarrolló la curva estándar de cortisol sanguíneo para comparar la concentración en las muestras.

VII. RESULTADOS

7.1 Análisis de gua

7.1.1 Parámetros fisicoquímicos

Los valores se observan en la Tabla 1. Se encontró que las concentraciones de aceites y grasas, demanda bioquímica de oxígeno, sulfuro y cromo IV estuvieron por debajo de los límites de detección (LD). Las concentraciones de pH, temperatura, oxígeno disuelto, conductividad, fósforo total, amoniaco y nitrato se encontraron por debajo de los valores límites de los ECAs-Agua, a excepción de la concentración de nitratos en el punto de monitoreo 2.

Tabla 1. Resultados del análisis de los parámetros fisicoquímicos en el agua.

Parámetros	Unidad	ECAs ¹	Punto 1	Punto 2	Punto 3	Punto 4
Potencial de Hidrógeno (pH)	Unidad de pH	6.5-9.0	8.51	8.29	8.44	7.46
Temperatura	°C	Δ 3	13.1	12.1	12.6	12.7
Oxígeno Disuelto (valor mínimo)	mg/L	≥ 5	7.12	6.92	6.83	6.2
Conductividad	μS/cm	1000	90.7	342	114.5	155.1
Aceites y grasas	mg/L	5,0	<0.2	<0.2	<0.2	<0.05
Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO)	mg/L	10	<1.0	<1.0	<1.0	<2.00
Fósforo Total	mg/L	0.05	0.03	0.027	0.042	0.027
Sulfuro	mg/L	0.002	<0.0008	<0.0008	<0.0008	<0.002
Amoniaco	mg/L	1.9	0.02	0.024	0.044	0.047
Nitrato	mg/L	13	0.305	15.467	0.987	0.678
Cromo VI	mg/L	0.011	<0.002	<0.002	<0.002	

¹ ECAs: Estándares Nacionales de Calidad Ambiental para agua; Categoría 4 (Conservación del ambiente acuático); Subcategoría E2 (Ríos). (MINAM, 2017)

Δ 3 Variación de 3 grados Celsius respecto al promedio mensual multianual del área evaluada

7.1.2 Coliformes termotolerantes

Las concentraciones de coliformes termotolerantes se encuentran por debajo de los valores límites del ECA-Agua (Tabla 2).

Tabla 2. Resultados del análisis de coliformes termotolerantes en el agua

Parámetro	Unidad	ECAs ¹	Punto 1	Punto 2	Punto 3	Punto 4
Coliformes Termotolerantes (44,5°C)	NMP/100 ml	2000	17	4.5	13	31

¹ ECAs: Estándares Nacionales de Calidad Ambiental para agua; Categoría 4 (Conservación del ambiente acuático); Subcategoría E2 (Ríos). (MINAM, 2017).

7.1.3 Metales pesados

Se encontró que las concentraciones de antimonio, arsénico, cadmio, mercurio, níquel, plomo (punto 4), selenio (Puntos 1 y 3), talio y zinc (Puntos 2 y 3) están por debajo del LD (Limite de detección). Las concentraciones de bario, cobre y zinc (Puntos 1 y 4) se encuentran por debajo de los valores límites del ECAs-Agua. Se encontró que la concentración de selenio excede los ECAs- Agua en los puntos de monitoreo 2 y 4 (Tabla 3).

Tabla 3. Resultados del análisis de metales pesados en el agua

Metales	Unidad	ECAs ¹	Punto 1	Punto 2	Punto 3	Punto 4
Antimonio (Sb)	mg/L	1.6	<0.00004	<0.00004	<0.00004	<0.002
Arsénico (As)	mg/L	0.15	<0.00003	<0.00003	<0.00003	<0.001
Bario (Ba)	mg/L	0.7	0.0206	0.0223	0.0291	0.034
Cadmio (Cd)	mg/L	0.00025	<0.00001	<0.00001	<0.00001	<0.0004
Cobre (Cu)	mg/L	0.1	0.00883	0.00483	0.00322	0.0014
Mercurio (Hg)	mg/L	0.0001	<0.00003	<0.00003	<0.00003	<0.001
Níquel (Ni)	mg/L	0.052	<0.0002	<0.0002	<0.0002	<0.0006
Plomo (Pb)	mg/L	0.0025	<0.0002	<0.0002	<0.0002	0.0009
Selenio (Se)	mg/L	0.005	<0.0004	0.0059	<0.0004	0.04
Talio (Tl)	mg/L	0.0008	<0.00002	<0.00002	<0.00002	<0.003
Zinc (Zn)	mg/L	0.12	0.0014	<0.0008	<0.0008	0.007

¹ ECAs: Estándares Nacionales de Calidad Ambiental para agua; Categoría 4 (Conservación del ambiente acuático); Subcategoría E2 (Ríos). (MINAM, 2017).

7.2 Análisis de trucha arcoíris

7.2.1 Medidas biométricas

El número de capturas por zona y las medidas biométricas de los peces se muestran en la Tabla 4. En total se obtuvieron 37 ejemplares de trucha arcoíris con un promedio de talla de 20.5 cm y peso de 138.7 g. En el punto de monitoreo 1 se obtuvo una mayor colecta, seguido por el punto 4, 3 y 2. Las medidas biométricas mostraron que el mayor promedio en peso y talla estuvieron en el punto 4, seguidas por el punto 1, 3 y 2.

Tabla 4. Número de peces colectados y promedios de talla y peso por zona.

	N° Peces colectados	Promedio de talla (cm)	Promedio de peso (g)
Zona 1	17	22.1 ± 5.9 0.27	184.9 ± 187.1 1.01
Zona 2	5	18.5 ± 3.2 0.17	96.6 ± 39.7 0.41
Zona 3	7	15.9 ± 0.7 0.05	59 ± 9.5 0.16
Zona 4	8	25.3 ± 2.9 0.11	214.1 ± 68.8 0.3

Los valores son expresados como promedio ± desviación estándar. El coeficiente de variación es mostrado en paréntesis.

7.2.2 Metales pesados en músculo

Los resultados del análisis de metales pesados en el músculo de los peces se muestran en la Tabla 5. Las concentraciones de los parámetros fueron contrastados con los Contenidos Máximos Permitidos dispuestos en el Manual “Indicadores Sanitarios y de Inocuidad para los Productos Pesqueros y Acuícolas para Mercado Nacional y de Exportación” del SANIPES (SANIPES, 2016). El análisis mostró que los valores obtenidos no sobrepasaron los Contenidos Máximos Permitidos en ninguno de los puntos de monitoreo y se encontraron por debajo del LD.

Tabla 5. Resultados del análisis de bioacumulación de metales pesados en músculo de trucha arcoíris (mg/kg).

Metal Pesado	CMP ¹						Punto 1	Punto 2	Punto 3	Punto 4
	Perú	Unión Europea	Unión Aduanera	China	Japón	Chile				
Cadmio	0.05	0.05	0.2	0.1			<0.02	<0.02	<0.02	<0.02
Mercurio	0.5	0.5	0.6		0.4	0.5	<0.02	<0.02	<0.02	<0.02
Plomo	0.3	0.3	1	0.5		2	<0.04	<0.04	<0.04	<0.04

¹CMP: Contenidos Máximos Permitidos de metales pesados en productos pesqueros y acuícolas de consumo humano directo. (SANIPES, 2016).

7.2.3 Cortisol plasmático

En la validación del kit de ELISA en truchas arcoíris, se obtuvo una concentración basal de cortisol plasmático de 230, después de la provocación con ACTH se obtuvieron concentraciones de 644 a los 15 min, 2627 a los 30 min, 3878 a los 45 min y 1293 a los 60 min (Figura 3). La concentración pico fue encontrada a los 45 min de estimulación.

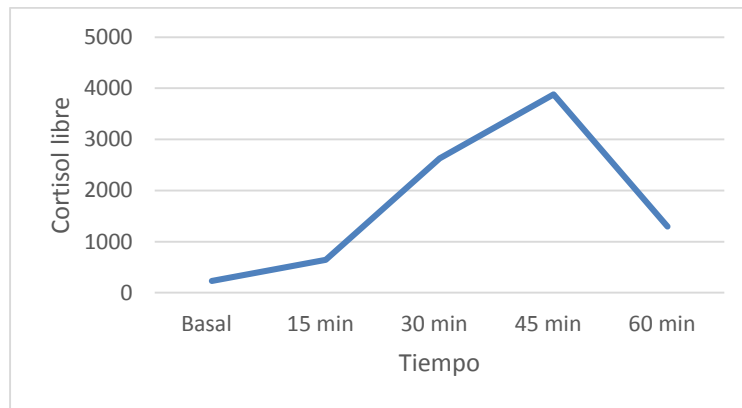


Figura 3. Concentraciones de cortisol plasmáticos después de la aplicación de ACTH (ng ml⁻¹).

En el desarrollo del estudio, la curva estándar ($y = -11.784x + 121.1$) mostró un alto coeficiente de correlación: $r^2 = 0.9578$ (Figura 4).

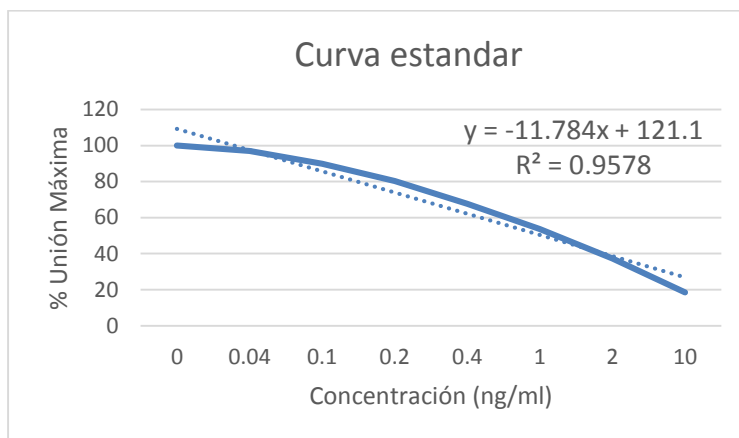


Figura 4. Curva estándar para la determinación de cortisol utilizando la concentración estándar (ng/ml) y el porcentaje de unión máxima de absorbancia. Donde el % de unión máxima representa la división de los promedios de cada valor de absorbancia estándar entre el valor de absorbancia S^0 , multiplicado por 100.

Los niveles de cortisol plasmático en los 37 ejemplares (mediana [Rango]; ng ml^{-1}) mostraron una concentración de 15.9 [0.1-788.5]. Las concentraciones más altas se encontraron en el punto de monitoreo 3 (35.9 [0.1-788.5]), seguidos por el punto de monitoreo 2 (23.4 [0.2-319.3]), el punto de monitoreo 4 (16.4 [0.6-154.8]), y finalmente el punto de monitoreo 1 (7.7 [0.6-67.9]).

VIII. DISCUSIÓN

A nivel nacional, la Autoridad Nacional del Agua (ANA) es la autoridad competente para desarrollar acciones en la gestión del agua. Sin embargo, no se ha encontrado registros disponibles de evaluaciones previas de la calidad de agua del río Challhuahuacho.

El análisis fisicoquímico del agua mostró concentraciones de pH, temperatura, oxígeno disuelto, conductividad, aceites y grasas, demanda bioquímica de oxígeno, fosforo total, nitrato (Puntos 1, 3 y 4), sulfuros, amoníaco y cromo IV por debajo de los valores límites de los ECAs-Agua. La concentración de nitrato se mostró por encima del ECA en el punto de monitoreo 2 (15.5 mg/L) (Tabla 2), la cual podría estar relacionada a la presencia de chancherías informales que colindan con el caudal a pocos metros del lugar de la toma de muestra. La agricultura y ganadería puede elevar los niveles de nitratos en el medio por la descomposición de sustancias nitrogenadas como la urea y proteínas (Sierra, 2011). Los nitratos y nitritos participan en el ciclo del nitrógeno (Camargo y Alonso, 2006). En los peces, la toxicidad del nitrato debe fundamentalmente a que una vez reabsorbido vuelve a la hemoglobina, hemocianina incapaz de transportar y liberar oxígeno (metahemoglobina, metahemocianina), pudiendo producir cianosis (Cheng y Chen, 2002). Se debe tener en cuenta que debido a la competencia con la absorción de cloruro, el nitrato es generalmente más tóxico para los peces de agua dulce, que para los de agua de mar, siendo los salmónidos una

de las especies más sensibles (Jensen, 2003). Incluso, estudios en laboratorio han demostrado que una concentración de nitrato de 10 mg/L puede afectar negativamente a animales acuáticos sensibles durante exposiciones a largo plazo, (Camargo *et al.*, 2005), siendo el valor de 2 mg/L considerado seguro para especies acuáticas (Rodríguez & Anzola, 2001).

Los resultados del análisis microbiológico en el agua mostraron concentraciones por debajo del ECA en los cuatro puntos de monitoreo (Tabla 3). A pesar de la presencia de vertimientos directos no autorizados de aguas residuales municipales, los resultados indican una calidad microbiológica adecuada. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que el estudio fue realizado en temporada de lluvias donde el caudal aumenta, por lo que las concentraciones de coliformes termotolerantes podrían aumentar en temporadas de bajo caudal.

En el análisis de metales pesados en agua se encontró que las concentraciones de antimonio, arsénico, bario, cadmio, mercurio, níquel, plomo, selenio (Puntos 1 y 3), talio y zinc se encuentran por debajo de los valores límites del ECAs-Agua (Tabla 4). Se encontró que las concentraciones de selenio en los puntos de monitoreo 2 y 4 exceden el ECA, siendo 0.0059 mg/L y 0.04 mg/L respectivamente (Tabla 4). El selenio presenta una paradoja interesante en el campo de la toxicología acuática porque es a la vez un nutriente y un veneno. Se trata un oligoelemento de origen natural que puede liberarse en los materiales de desecho de ciertas operaciones de fabricación

minera, agrícola, petroquímica e industrial. Una vez en el ambiente acuático, puede alcanzar rápidamente niveles que son tóxicos para los peces y su vida útil debido a la bioacumulación en las cadenas alimentarias y la exposición dietética resultante (Lemly, 2002). La minería tiene una larga historia de problemas medioambientales asociados principalmente a la eliminación de los residuos de la roca y al agua utilizada para procesar el mineral. Los minerales suelen tener cierta cantidad de selenio, y el tratamiento físico / químico de este mineral para extraer el metal deseado a menudo libera selenio y otros constituyentes en el agua de proceso o los desechos sólidos que quedan. Estos desechos a menudo contaminan los hábitats acuáticos locales (Lemly, 2004). En el Estudio de Impacto Ambiental del proyecto Las Bambas (2011) y sus modificaciones posteriores, la empresa habría identificado, como impactos ambientales del agua superficial, la alteración de la calidad del agua superficial por incremento de metales. Sin embargo, en este estudio los valores que se muestran por encima del ECA fueron encontrados tanto en el punto de monitoreo 2 como en el 4, donde el agua de este último pertenece a una fuente de manantial que no se encuentra afectada por factores antropogénicos. Por lo cual, las concentraciones encontradas podrían ser características propias del agua de la zona.

En todo el mundo, las comunidades de peces son reconocidas como una buena herramienta de ayuda para la toma de decisiones en materia ambiental (Boulton 1999), ya que pueden indicar la calidad del medio acuático (McDowall y Taylor 2000) y diversos niveles de alteración (Wichert y Rapport 1998). Son consideradas también,

como un vector de comunicación útil para sensibilizar al público y a las autoridades sobre la necesidad de preservar la calidad de ríos y lagos (Cowx y Collares Pereira, 2002). Sin embargo, a pesar de que se ha señalado que no son buenos indicadores ambientales por su movilidad (Chandler, 1970), los peces siguen siendo utilizados con frecuencia como bioindicadores debido a que se les puede encontrar en cualquier cuerpo de agua, son fáciles de identificar en el campo, generalmente alcanzan tallas grandes, presentan vistosos patrones de coloración en el cuerpo, no requieren de un equipo sofisticado para su manipulación, y se puede realizar un seguimiento de las poblaciones a través del tiempo (de la Lanza Espino *et al.*, 2011). Además, ya que son objeto de interés por parte de la comunidad local, ésta puede aportar información sobre posibles cambios en las poblaciones de peces (de la Lanza Espino & Hernández, 2003). En Challhuahuacho, la comunidad local ha sido de gran ayuda. A pesar de que no se cuenta con datos científico sobre la población de trucha arcoíris en esta zona ni con estudios de índices de captura de años previos, son los pobladores quienes han señalado la disminución de la población de truchas y la han asociado con el movimiento de tierras que se da desde la construcción de la minera Las Bambas (Vergara, 2014). En octubre de 2016, durante la quinta reunión del Grupo de Trabajo de la “Mesa de diálogo para el desarrollo de la Provincia de Cotabambas”, un representante de las comunidades campesinas de Challhuahuacho, también manifestó su preocupación sobre la muerte de peces en las orillas del río. Durante el desarrollo del trabajo de campo de este estudio no se observó la presencia de peces muertos en las áreas de monitoreo, pero el método de captura por unidad de esfuerzo permitió identificar las zonas con mayor y menor

población de truchas. En total, se logró la captura de 37 ejemplares en un total de 40 lances de atarraya (Tabla 6). El punto de monitoreo donde se obtuvo una mayor colecta fue el punto 1, el cual corresponde a la parte alta del río Challhuahuacho y posee un caudal más abundante que los otros puntos. De igual manera, el punto de monitoreo donde se encontró el mayor promedio en peso y talla fue el punto 4, el cual corresponde al manante Chahuapuquio. Esto puede deberse a que en este lugar las truchas se encuentran confinadas y tienen el espacio suficiente para completar su desarrollo.

Durante el desarrollo del estudio se pudo constatar que en el río Challhuahuacho se realiza la pesca artesanal de trucha y que, sin embargo, son vendidas en el mercado local como “truchas de Cusco” debido al temor de la población de consumir un producto posiblemente contaminado con metales pesados. Los resultados de la Tabla 6 muestran la concentración de metales pesados en el músculo de las truchas en contraste con los Contenidos Máximos Permitidos dispuestos en el Manual “Indicadores Sanitarios y de Inocuidad para los Productos Pesqueros y Acuícolas para Mercado Nacional y de Exportación” del SANIPES. El análisis confirma que los valores obtenidos no sobrepasaron los Contenidos Máximos Permitidos en ninguno de los puntos de monitoreo, lo cual concuerda con las bajas concentraciones de metales pesados encontradas en el agua, por lo tanto, puede afirmarse que este indicador no representa un riesgo para la salud humana. En algunos estudios se argumenta que medir la concentración de metales en el hígado es más relevante respecto a la concentración de exposición a metales, siendo el principal órgano para detectar procesos de

bioacumulación producidos por la rápida descontaminación del tejido muscular (Maceda-Veiga et al., 2012). Pero, si bien es cierto que el hígado permite obtener información del estado de contaminación a corto plazo (Luoma & Rainbow, 2011), en el músculo se reflejan los niveles de contaminantes persistentes en el entorno, por ser el órgano que responde más lentamente a los cambios ambientales de estas sustancias (Jaramillo, 2009). La importancia de analizar el músculo estriado también ha sido reflejado en el estudio de Huancaré (2014), donde si bien los niveles de metales pesados medidos en agua no superaron el límite máximo permisible, en el músculo de las truchas arcoíris se hallaron alteraciones histológicas importantes, como edema intramuscular y degeneración hialina y granular. Finalmente, el músculo estriado del pez además de ser importante para su movimiento, representa la porción comestible para el hombre, por lo que su evaluación debería ser considerada necesaria en estudios, como el presente, donde se evalúan peces que forman parte de la dieta.

Para complementar el estudio se realizó una prueba de ELISA competitiva para cortisol plasmático en las truchas con el fin de evaluar la respuesta de los peces a los estresores encontrados. Previamente se logró validar el kit de ELISA de Neogen en las truchas arcoíris del andes peruanos por lo que este método podría usarse como una herramienta factible para medir los eventos estresantes en esta especie. Aunque los niveles más altos de cortisol encontrados en salmónidos estresados han sido de 600-700 ng/mL (Kiessling *et al.*, 2009), típicamente, los niveles de cortisol alcanzados como resultado de factores de estrés crónico son similares a los logrados como resultado de un factor

de estrés agudo (es decir, 40-250 ng/mL) (Fast *et al.*, 2008). Los niveles de cortisol permanecen elevados en plasma durante aproximadamente 6 h, después de lo cual los niveles de reposo se alcanzan una vez más (Fast *et al.*, 2008).

Con respecto al estrés agudo, el uso de cortisol como un marcador ha demostrado ser ventajoso debido a diferentes razones: la liberación no es tan rápida como para prevenir su uso como marcador de estrés, como en el caso de las catecolaminas, lo que facilita su obtención mediante mediciones previas al estrés (Ellis *et al.*, 2012); la respuesta del cortisol al estrés es intensa, proporcionando diferencias claras y fáciles de detectar entre animales estresados y no estresados (Mommsen *et al.*, 1999), y su intensidad se correlaciona con la intensidad del factor estresante para una especie determinada (Gesto *et al.*, 2015); la dinámica de la respuesta al estrés es relativamente rápida y los niveles observados se relacionan bien con los eventos recientes experimentados por el animal (Ellis *et al.*, 2012; Gesto *et al.*, 2013); y, finalmente, su análisis con técnicas inmunológicas, como el ELISA, es relativamente económico, fácil y rápido (Ellis *et al.*, 2012). En el presente estudio, los niveles de cortisol plasmático (mediana [rango]; ng/mL) más altos en truchas arcoíris se encontraron en el punto de monitoreo 3 (35.9 [0.1-788.5]), seguidos por el punto de monitoreo 2 (23.4 [0.2-319.3]), el punto de monitoreo 4 (16.4 [0.6-154.8]), y, finalmente, el punto de monitoreo 1 (7.7 [0.6-67.9]). Los 4 puntos de monitoreo mostraron niveles por debajo de los encontrados en estudios previos donde los peces se encontraban frente a factores de estrés. Debido a que no se encontraron metales pesados en el músculo de las truchas y en los resultados del

análisis de agua no se detectaron parámetros que puedan considerarse como factores de estrés, los niveles plasmáticos de cortisol de este estudio fueron los esperados.

Las concentraciones de cortisol plasmático encontradas se presentaron en un rango bastante amplio en los 4 puntos de monitoreo. Se sabe que su aumento se asocia con frecuencia a factores estresantes de corto plazo (Bayunova *et al.*, 2002). Los salmónidos son una de las especies que responden casi de inmediato al manejo y al estrés por hacinamiento (Carey & McCormick, 1998, Schreck *et al.*, 2001), por lo que los valores más altos observados podrían estar asociados con estas condiciones, especialmente, con el estrés de la captura, manejo y a las diferencias en el tiempo entre la captura y el muestreo de los individuos obtenidos en una misma red de pesca. Si bien son los más utilizados, los indicadores neuroendocrinos (cortisol y adrenalina) y hematológicos y metabólicos (niveles de glucosa, lactato, iones del plasma, transaminasas) (Pratap & Wendelaar Bonga, 1990; Rotlant, *et al.*, 2000; Scott *et al.*, 2003; Witeska, 2005), pueden ser influenciados por los procedimientos de manejo humano (Coronato, 1999). Por ello, otras alternativas, como el análisis de los cambios de las proteínas de choque térmico (HSP) en los tejidos, han sido probadas (Iwama *et al.*, 1998). Estas proteínas intervienen en la respuesta de estrés celular, ayudando a la célula a conservar o degradar las proteínas desnaturalizadas para que, una vez que el estrés haya cedido, puedan volver al plegamiento inicial, recuperar su conformación tridimensional y, por lo tanto, su función. Las HSP aumentan en cualquier situación estresante para un organismo, por lo que son muy prometedoras como biomarcadores de estrés generalizado en poblaciones expuestas a contaminantes ambientales,

patógenos o mala calidad del agua (Coronato, 1999). Asimismo, otros bioindicadores también pueden ser muy útiles para la determinación de los efectos de agentes contaminantes químicos (p. ej., metales y plaguicidas), como los ácidos grasos, que son muy sensibles a los factores estresantes, o las metalotioneínas (Bayir *et al.*, 2013; Filimonova, *et al.*, 2016). Estas últimas son proteínas que se inducen con una función protectora en los tejidos hepáticos, renal y branquial cuando los peces son expuestos a metales pesados a altas concentraciones, previniendo sus efectos (Foran *et al.*, 2004). Finalmente, los bioindicadores de estrés son una herramienta útil para demostrar la presencia de factores causantes de estrés y, con ello, su posible prevención.

IX. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- Los parámetros fisicoquímicos, las concentraciones de coliformes termotolerantes, y las concentraciones de metales pesados en agua del río Challhuahuacho fueron comparados con los Estándares de Calidad Ambiental para agua y se demostró que estos factores no presentan un riesgo para el equilibrio del ecosistema acuático.
- Las concentraciones de metales pesados en el músculo de las truchas se encontraron por debajo de los Contenidos Máximos Permitidos, por lo que se considera que este indicador no presenta un riesgo para la salud humana.
- La prueba de Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA) para cortisol plasmático mostró bajos niveles de estrés en las truchas arcoíris que comprueban la ausencia de estresores en su medio acuático.
- La investigación presentada puede servir de base para futuros estudios y puede ser considerada como punto de partida para llevar a cabo un análisis de riesgo (AR) aplicado a la zona de influencia minera directa.
- Se recomienda realizar un análisis microbiológico y de metales pesados periódico con una frecuencia de monitoreo de acuerdo a la estacionalidad, siendo conveniente realizar el muestreo tanto en época de avenida como de estiaje y con la posibilidad de ampliar la frecuencia de acuerdo a los impactos que se generen en los recursos hídricos y la población.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdel-Meguid, N., Kheirallah, A. M., Abu-Shaban, K., & Abdel-Moneim, A. (2002). Histochemical and biochemical changes in liver of *Tilapia zilli* G. as a consequence of water pollution. *Online Journal of Biological Science*, 2, 224-229.
- Ackerman, P. A., & Iwama, G. K. (2001). Physiological and cellular stress responses of juvenile rainbow trout to vibriosis. *Journal of Aquatic Animal Health*, 13(2), 173-180.
- Afonso, L. O. B., Basu, N., Nakano, K., Devlin, R. H., & Iwama, G. K. (2003). Sex-related differences in the organismal and cellular stress response in juvenile salmon exposed to treated bleached kraft mill effluent. *Fish Physiology and Biochemistry*, 29(2), 173-179.
- Arkoosh, M. R., Casillas, E., Clemons, E., Kagley, A. N., Olson, R., Reno, P., & Stein, J. E. (1998). Effect of pollution on fish diseases: potential impacts on salmonid populations. *Journal of Aquatic Animal Health*, 10(2), 182-190.
- Astete, J., Gastañaga, M. D. C., & Pérez, D. (2014). Niveles de metales pesados en el ambiente y su exposición en la población luego de cinco años de exploración minera en Las Bambas, Perú 2010. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 31(4), 695-701.
- Autoridad Nacional del Agua (ANA). (2016). Resolución Jefatural N°010-2016-ANA. Protocolo Nacional de Monitoreo de la Calidad de los Recursos Hídricos

Superficiales. Recuperado de:

http://www.ana.gob.pe/sites/default/files/publication/files/protocolo_nacional_para_el_monitoreo_de_la_calidad_de_los_recursos_hidricos_superficiales.pdf

Autoridad Nacional del Agua (ANA). (2017). Informe técnico (002-2017-ANA-A.A.A.PA-ALA.MAP-AT/MGM).

Bayunova, L., Barannikova, I., & Semenkova, T. (2002). Sturgeon stress reactions in aquaculture. *Journal of Applied Ichthyology*, 18(4- 6), 397-404.

Beitinger, T. L., & McCauley, R. W. (1990). Whole-animal physiological processes for the assessment of stress in fishes. *Journal of Great Lakes Research*, 16(4), 542-575.

Barry, T. P., Lapp, A. F., Kayes, T. B., & Malison, J. A. (1993). Validation of a microtitre plate ELISA for measuring cortisol in fish and comparison of stress responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and lake trout (*Salvelinus namaycush*). *Aquaculture*, 117(3-4), 351-363.

Barton, B. A. (2011). Stress in finfish: past, present and future-a historical perspective. *Fish stress and health in aquaculture*, 62, 1.

Barandica Cañón, L., & Tort Bardolet, L. (2010). Efectos de las dietas experimentales en la respuesta inmune de los peces.

Bayir, M., Sirkecioglu, A. N., Bayir, A., & Aras, M. (2013). Alterations in fatty acids of polar lipids in *Salmo trutta* on long-term exposure to a glyphosate-based

- herbicide (Roundup). *Pakistan journal of biological sciences: PJBS*, 16(20), 1194-1198.
- Boulton, A. J. (1999). An overview of river health assessment: philosophies, practice, problems and prognosis. *Freshwater Biology*, 41(2), 469-479.
- Camargo, J. A., Alonso, A., & Salamanca, A. (2005). Nitrate toxicity to aquatic animals: a review with new data for freshwater invertebrates. *Chemosphere*, 58(9), 1255-1267.
- Camargo, J.A. y Alonso, A. (2006). Ecological and toxicological effects of inorganic nitrogen pollution in aquatic ecosystems: a global assessment. *Environment International* 32: 831-849.
- Carey, J. B., & McCormick, S. D. (1998). Atlantic salmon smolts are more responsive to an acute handling and confinement stress than parr. *Aquaculture*, 168(1), 237-253.
- Chandler, J. R. (1970). A biological approach to water quality management. *Water Pollution Control*, 69, 415-422.
- CooperAcción (2016). Metales pesados tóxicos y salud pública: El caso Espinar. Recuperado de: <http://cooperaccion.org.pe/wp-content/uploads/2017/11/ESPINAR-Informe-sobre-salud-4-1.pdf>
- Coronato, Wanda di Girolamo, Margarita Salas, Osvaldo Spinelli, Graciela Laguens (1999). Biología de las proteínas del shock térmico. 59: 477-486

- Cowx, I. G., & Collares-Pereira, M. J. (2002). Freshwater fish conservation: options for the future. *Conservation of Freshwater Fishes: Options for the Future.*, 443-452.
- de la Lanza Espino, G. y S. Hernández Pulido (2003). *Manual para la colecta, el manejo y las observaciones de campo para bioindicadores de la calidad del agua*. AGT, México D. F. 223 pp.
- de la Lanza Espino, G., S. Hernández Pulido y J. L. Carbajal Pérez (2011). Organismos Indicadores de la Calidad del Agua y de la Contaminación. Ciencia y Tecnología (TDF), UNAM-IB y PyV, México.
- ELIKA. (2009). Nitritos: fichas sustancias indeseables alimentación Animal. Fundación Vasca para la Seguridad Agroalimentaria. Recuperado de: http://www.elika.net/datos/pdfs_agrupados/documento46/nitritos.pdf
- Ellis, T., Yildiz, H. Y., López-Olmeda, J., Spedicato, M. T., Tort, L., Øverli, Ø., & Martins, C. I. (2012). Cortisol and finfish welfare. *Fish physiology and biochemistry*, 38(1), 163-188.
- Farrell, A. P., Gallagher, P. E., & Routledge, R. (2001). Rapid recovery of exhausted adult coho salmon after commercial capture by troll fishing. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 58(12), 2319-2324.
- Fast, M. D., Hosoya, S., Johnson, S. C., & Afonso, L. O. (2008). Cortisol response and immune-related effects of Atlantic salmon (*Salmo salar* Linnaeus) subjected to short-and long-term stress. *Fish & shellfish immunology*, 24(2), 194-204.

- Filimonova, V., Gonçalves, F., Marques, J. C., De Troch, M., & Gonçalves, A. M. (2016). Fatty acid profiling as bioindicator of chemical stress in marine organisms: a review. *Ecological indicators*, 67, 657-672.
- Foran, J.A.; Hites, R.A.; Carpenter, D.O.; Hamilton, M.C.; Mathews-Amos, A.; Schwager, S.J. (2004). A survey of metals in tissues of farmed atlantic and wild pacific salmon. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 23: 2108-10.
- Gesto, M., López-Patiño, M. A., Hernández, J., Soengas, J. L., & Míguez, J. M. (2013). The response of brain serotonergic and dopaminergic systems to an acute stressor in rainbow trout: a time course study. *Journal of Experimental Biology*, 216(23), 4435-4442.
- Gesto, M., López- Patiño, M. A., Hernández, J., Soengas, J. L., & Míguez, J. M. (2015). Gradation of the stress response in rainbow trout exposed to stressors of different severity: the role of brain serotonergic and dopaminergic systems. *Journal of neuroendocrinology*, 27(2), 131-141.
- Gobierno Regional de Apurímac. (2015). Plan de desarrollo económico regional Apurímac 2010 – 2021. Recuperado de: [http://www.mesadeconcertacion.org.pe/sites/default/files/archivos/2015/documentos/11/3_pdroc_apurimac_al_2021 .pdf](http://www.mesadeconcertacion.org.pe/sites/default/files/archivos/2015/documentos/11/3_pdroc_apurimac_al_2021.pdf)
- Gobierno Regional de Apurímac (2016). Informe N° 1215-2016, Análisis bacteriológico. 23 de Mayo de 2016.
- Gobierno Regional de Apurímac (2016). Informe N° 01196-2016. Análisis fisicoquímico. 23 de Mayo de 2016.

- Gobierno Regional de Apurímac (2016). Informe N° 103588-2016. Análisis de metales pesados. 10 de Junio de 2016.
- González Acosta, J. A. (2015). Caracterización de sedimentos producidos en una explotación intensiva de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792), como un medio para definir estrategias de uso y manejo sostenible de lagunas de oxidación en piscicultura.
- Herrera, N. E., Astocondor, M. M., Loarte, J. P., & Baylón, A. R. (2006). ESTRATEGIAS REGIONALES DE GESTIÓN AMBIENTAL. EL CASO DEL PROYECTO MINERO LAS BAMBAS DE APURÍMAC. *Gestión en el Tercer Milenio*, 9(18), 33-39.
- Hofmann, G. E., & Todgham, A. E. (2010). Living in the now: physiological mechanisms to tolerate a rapidly changing environment. *Annual review of physiology*, 72, 127-145.
- Huancaré, R. K. (2014). Identificación histopatológica de lesiones inducidas por bioacumulación de metales pesados en branquias, hígado y músculo de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) de cultivo en etapa comercial de la laguna de Mamacocha, área de influencia minera, Cajamarca-Perú. Tesis de grado, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Facultad de Medicina Veterinaria.
- Iwama, G. K. (1991) Interactions between aquaculture and the environment. *Critical Reviews in Environmental Control*, 21, 177-216.
- Jaramillo, L. A. (2009). Estudio de la biología trófica de cinco especies de peces bentónicos de la costa de Cullera. Relaciones con la acumulación de metales

- pesados. Tesis de Doctorado, Universidad Politécnica de Valencia.
Departamento de Ingeniería Hidráulica y Medio Ambiente.
- Jensen, F. B. (2003). Nitrite disrupts multiple physiological functions in aquatic animals. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 135(1), 9-24.
- Kiessling, A., Johansson, D., Zahl, I. H., & Samuelsen, O. B. (2009). Pharmacokinetics, plasma cortisol and effectiveness of benzocaine, MS-222 and isoeugenol measured in individual dorsal aorta-cannulated Atlantic salmon (*Salmo salar*) following bath administration. *Aquaculture*, 286(3-4), 301-308.
- Kumar, G., & Nandan, B. (2014). Copper Toxicity: haematological and histopathological changes and prophylactic role of vitamin C in the fish, *Anabas testudineus* (Bloch, 1792). *Zoological Studies*, 1, 4-13.
- La República. (2015, 7 de noviembre). Contratista de Las Bambas contaminó una laguna. Recuperado de: <http://larepublica.pe/imprensa/sociedad/716469-contratista-de-las-bambas-contamino-una-laguna>
- Las Bambas. (2017). Acerca de Las Bambas. Recuperado de: <http://www.lasbambas.com/acerca-de-las-bambas/proyecto-las-bambas.html>
- Lemly, A. D. (2004). Aquatic selenium pollution is a global environmental safety issue. *Ecotoxicology and environmental safety*, 59(1), 44-56.
- Lemly, A. D. (2002). Symptoms and implications of selenium toxicity in fish: the Belews Lake case example. *Aquatic Toxicology*, 57(1), 39-49.

- Leon, G. (1995). Parámetros de calidad para el uso de aguas residuales. Guías de calidad de efluentes para la protección de la salud. Recuperado de: http://www.bvsde.paho.org/bvsair/e/repindex/rep184/vleh/fulltext/acrobat/leon_2.pdf
- Letterman, R., & American Water Works Association. (2002). Calidad y tratamiento del agua: manual de suministros de agua contaminada. *Mc Graw-Hill edición. Madrid.*
- Lewis, S., Handy, R. D., Cordi, B., Billingham, Z., & Depledge, M. H. (1999). Stress proteins (HSP's): methods of detection and their use as an environmental biomarker. *Ecotoxicology*, 8(5), 351-368.
- Luoma, S.N., Rainbow, P.S. (2011). Metal Contamination in Aquatic Environments: Science and Lateral Managment. Cambridge University Press, Cambridge, UK. ISBN: 978-0-521-27901-7 pp.573
- Maceda-Veiga, A., Monroy, M., & de Sostoa, A. (2012). Metal bioaccumulation in the Mediterranean barbel (*Barbus meridionalis*) in a Mediterranean River receiving effluents from urban and industrial wastewater treatment plants. *Ecotoxicology and environmental safety*, 76, 93-101.
- Madera, C.A. (Junio de 2006). Las aguas residuales y su uso en la piscicultura: normas de Calidad y tecnologías de tratamiento. III Seminario Nacional de Ingeniería de Producción Acuícola. Seminario llevado a cabo en Pasto. Recuperado de: <http://revistas.udenar.edu.co/index.php/reipa/article/viewFile/1611/1966>

- McDowall, R. M., & Taylor, M. J. (2000). Environmental indicators of habitat quality in a migratory freshwater fish fauna. *Environmental Management*, 25(4), 357-374.
- Ministerio de la Producción (PRODUCE). (2010) Elaboración de estudio de mercado de la trucha en Arequipa, Cusco, Lima, Huancayo y Puno. Recuperado de: <http://www2.produce.gob.pe/RepositorioAPS/3/jer/DGA-PUBLICACIONES/estudio-de-mercado-trucha.pdf>
- Ministerio del Ambiente (MINAM) (2017). Decreto Supremo N° 004-2017. Estándares de Calidad Ambiental (ECA) para Agua y establecen Disposiciones Complementarias. El Peruano, Perú, 07 de Junio de 2017.
- Ministerio de Salud (MINSA) (2010). Perfil epidemiológico de las poblaciones aledañas al Proyecto Minero Las Bambas Ii – Apurímac 2010. Recuperado de: http://www.bvs.ins.gob.pe/insprint/censopas/metales_pesados/informe_bambas_2010.pdf
- Mommsen, T. P., Vijayan, M. M., & Moon, T. W. (1999). Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 9(3), 211-268.
- Nakano, T. (2011). Stress in fish. *Yoshoku (Aquaculture Magazine)*, 48, 64-67.
- Nakano, T., Kameda, M., Yamaguchi, T., Sato, M., Afonso, L. O., Iwama, G. K., & Devlin, R. H. (2015). Effects of Thermal Stressors on Growth-Related Gene Expressions in Cultured Fish. En *Marine Productivity: Perturbations and*

Resilience of Socio-ecosystems (pp. 147-157). Springer International Publishing.

Organismo de Evaluación y Fiscalización Ambiental (OEFA). (2014). Mesas de diálogo (Boletín electrónico N° 02 – 2014). Recuperado de: https://www.oefa.gob.pe/?wpfb_dl=11568

Organización Mundial de la Salud (WHO). (1990). The International Drinking Water Supply and Sanitation Decade: review of decade progress (as at December 1988.). Recuperado de: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/58581/1/WHO_EHE_CWS_90.16.pdf

Organismo Nacional de Sanidad Pesquera (SANIPES) (2016). Resolución N° 057-2016-SANIPES-DE. Indicadores Sanitarios y de Inocuidad para los Productos Pesqueros y Acuícolas para Mercado Nacional y de Exportación. El Peruano, Perú, 23 de Junio de 2016.

Pankhurst, N. W. (2011). The endocrinology of stress in fish: an environmental perspective. *General and comparative endocrinology*, 170(2), 265-275.

Pratap, H. B., & Wendelaar Bonga, S. E. (1990). Effects of water-borne cadmium on plasma cortisol and glucose in the cichlid fish *Oreochromis mossambicus*.

Presidencia del Consejo de Ministros (PCM). (Marso de 2016). La gestión social y el caso Las Bambas (Publicación N° 40). Recuperado de: <http://onds.pcm.gob.pe/wp-content/uploads/2016/03/W401.pdf>

Posicion (2017, 7 de Febrero). Challhuahuacho y el fracaso del estado. Posicion.

Recuperado de: <http://www.posicion.pe/2017/02/challhuahuacho-y-el-fracaso-del-estado/>

Reid, S. G., Vijayan, M. M., & Perry, S. F. (1996). Modulation of catecholamine storage and release by the pituitary-interrenal axis in the rainbow trout,

Oncorhynchus mykiss. *Journal of Comparative Physiology B*, 165(8), 665-676.

Rodriguez, H., & Anzola, E. (2001). La calidad del agua y la productividad de un

estanque en acuicultura. *Rodriguez, H.; Daza, P.; Carrillo, M. Fundamentos de acuicultura continental. Instituto de Pesca y Acuicultura. Bogotá. República de Colombia, 57-59.*

Rose, J., Hutcheson, M. S., West, C. R., Pancorbo, O., Hulme, K., Cooperman, A., ...

& Screpetis, A. (1999). Fish mercury distribution in Massachusetts, USA lakes. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 18(7), 1370-1379.

Rotllant, J., Arends, R. J., Mancera, J. M., Flik, G., Bonga, S. E. W. and Tort, L. (2000).

Inhibition of HPI axis response to stress in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) with physiological plasma levels of cortisol. *Fish Physiol. Biochem.* 23, 13-22.

Santamaría, Y. V., & Casallas, P. C. (2007). Metodología para la determinación de

cortisol plasmático en peces usando la prueba de inmunoensayo enzimático (ELISA). *Revista MVZ Córdoba*, 12(1).

Schreck, C. B., Contreras-Sanchez, W., & Fitzpatrick, M. S. (2001). Effects of stress

on fish reproduction, gamete quality, and progeny. *Aquaculture*, 197(1), 3-24.

- Scott, G. R., Sloman, K. A., Rouleau, C., & Wood, C. M. (2003). Cadmium disrupts behavioural and physiological responses to alarm substance in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Experimental biology*, 206(11), 1779-1790.
- Sierra Ramirez, C. A. (2011). Calidad del agua. Evaluación y diagnóstico. Sello Editorial de la Universidad de Medellín. pp 47-69.
- Skinner, L. A., LaPatra, S. E., Adams, A., Thompson, K. D., Balfry, S. K., McKinley, R. S., & Schulte, P. M. (2010). Supra-physiological levels of cortisol suppress lysozyme but not the antibody response in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., following vaccine injection. *Aquaculture*, 300(1), 223-230.
- SUNASS (2008). Estudio Diagnóstico Situacional de los Sistemas de Tratamiento de Aguas Residuales en las EPS del Perú y Propuestas de Solución. Lima: SUNASS. Recuperado de: http://www.proagua.org.pe/files/de62b65581b727d66847f48aa52fbbfd/Libro_PTAR.pdf
- Tintos, A., Míguez, J. M., Mancera, J. M., & Soengas, J. L. (2006). Development of a microtitre plate indirect ELISA for measuring cortisol in teleosts, and evaluation of stress responses in rainbow trout and gilthead sea bream. *Journal of fish biology*, 68(1), 251-263.
- U.S. EPA. 2014. "Method 6020B (SW-846): Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry," Revision 2. Washington, DC.

- Vergara, F. E. (2014). Conflictos mineros y transformaciones territoriales: Acerca del proyecto minero Las Bambas, Apurímac, Perú. *Universidad Nacional Mayor de San Marcos*.
- Vollenweider, R.A. (1968). Scientific fundamentals of the eutrophication of lakes and flowing waters, with particular reference to nitrogen and phosphorus as factors in eutrophication. Rep. Organis. Econ. Coop. And Dev., DAS/CSI/68.27. Paris.
- Wendelaar Bonga, S. W. (1997). The stress response in fish. *Physiological reviews*, 77(3), 591-625
- Wichert, G. A., & Rapport, D. J. (1998). Fish community structure as a measure of degradation and rehabilitation of riparian systems in an agricultural drainage basin. *Environmental Management*, 22(3), 425-443.
- Witeska, M. (2005). Stress in fish-hematological and immunological effects of heavy metals. *Electronic Journal of Ichthyology*, 1(1), 35-41.
- Yee-Batista, C. (diciembre, 2013). Un 70% de las aguas residuales de Latinoamérica vuelven a los ríos sin ser tratadas. Banco Mundial, BIRF – AIF. Recuperado de: <http://www.bancomundial.org/es/news/feature/2014/01/02/rios-de-latinoamerica-contaminados>>

VIII. ANEXOS

Anexo 1. Tipos de envases y métodos de preservación y de análisis de agua.

Parámetro	Tipo de envase	Método de preservación	Método de análisis
Fisicoquímicos			
Aceites y grasas	Frasco Vidrio ámbar	Adición de H ₂ SO ₄ hasta pH<2	ASTM D3921 - 96 (Reapproved 2011).
	500 ml boca ancha	(2.5 ml H ₂ SO ₄ 1:1).	Standard Test Method for Oil and Grease and Petroleum Hydrocarbons in Water - Validado (2014)
Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO)	Frasco PVC 1 L boca ancha (Transparente)	Frasco llenado completamente, sin dejar burbujas de aire. Almacenaje de: >0°C a <=4°C	SMEWW-APHA-AWWA-WEF Part 5210 B. 2012; 22nd Ed. Biochemical Oxygen Demand (BOD): 5-Day BOD Test
	Frasco PVC 250 ml boca ancha (Transparente)	Adición de H ₂ SO ₄ hasta pH<2 (2 ml H ₂ SO ₄ 1:1). Almacenaje de >0°C a <=4°C	SMEWW-APHA-AWWA-WEF Part 4500-PB Item 5, E: 2012;22nd Ed. - Phosphorus. Sample Preparation 5. Persulfate Digestion Method. Ascorbic Acid Method
Nitrato	Frasco PVC 100 ml boca ancha	Almacenaje de >0°C a <=4°C	EPA 300.0. Rev. 2.1. 1993. Determination Of Inorganic Anions By Ion Chromatography.
Sulfuro	Frasco PVC 500 ml boca ancha (Transparente)	Adición de 20 gotas de acetato de zinc 2N y 20 gotas de NAOH 6N hasta pH>9. Almacenaje de: >0°C a <=4°C	SMEWW-APHA-AWWA-WEF Part 4500 S2 - D:2012; 22nd. - Sulfide. Methylene Method

Amoniaco	Frasco PVC 250 ml boca ancha (Transparente)	Adición de H ₂ SO ₄ , pH<2, almacenaje de: >0°C a <= 4°C (2 ml de h ₂ so ₄ , 1:1)	SMEWW-APHA-AWWA-WEF Part 4500-NH ₃ D: 2012; 22nd Ed.- Nitrogen (Ammonia). Ammonia-Selective Electrode Method
Cromo VI	Frasco PVC 500 ml boca ancha (Transparente)	Adición de 4 ml de solución buffer NH ₄ SO ₄ más 5 ml de NOAH 1N. Almacenaje de >0°C a <=4°C	SMEWW-APHA-AWWA-WEF Part 3500-Cr-B, 22nd. (Validado) 2012 Chromium. Colorimetric Method
Metales pesados			
	Frasco PVC 250 ml boca ancha (Transparente)	Adición de HNO ₃ hasta pH<2 (15 gotas de HNO ₃ 1:1).	EPA 200.8: 1994 Rev 5.4 Determination of Trace Elements in Waters and Wastes by Inductively Coupled Plasma - Mass Spectrometry
Microbiológico			
Coliformes Termotolerantes (44.5°C)	Frasco vidrio 250 ml microbiológico	Refrigeración <8°C. No se elimina la cubierta de la botella. El frasco se llena 3/4 partes dejando espacio para la aireación y homogenización.	SMEWW-APHA-AWWA-WEF Part 9221 E.1, 22nd Ed. 2012 Multiple-Tube Fermentation Technique for Members of the Coliform Group. Fecal Coliform Procedure. Thermotolerant Coliform Test (EC Medium)