

030851



*Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología*  
Universidad Nacional Autónoma de México



**ESTUDIO DE LA TOXICIDAD AGUDA POR Cd, Cu, Fe, Hg, Mn,  
Pb y Zn SOLOS Y EN COMBINACION EN POSTLARVAS DE  
*Litopenaeus vannamei***

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE  
**DOCTOR EN CIENCIAS**  
(OCEANOGRAFIA BIOLOGICA Y PESQUERA)  
PRESENTA  
**M. en C. MARTIN GABRIEL FRIAS ESPERICUETA**

DIRECTOR DE TESIS: DR. DOMENICO VOLTOLINA LOBINA

COMITE TUTORAL: DRA. MARIA ESTHER DE LA ROSA DUQUE  
DR. FEDERICO PAEZ OSUNA

MAZATLAN, SINALOA

2002

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Este trabajo se llevó a cabo en la Facultad de Ciencias del Mar, bajo la dirección del Dr. Domenico Voltolina Lobina, y con apoyo parcial del proyecto CONACYT "Monitoreo de metales pesados en sedimentos y camarones cultivados (*Litopenaeus stylirostris* *Litopenaeus vannamei*) en granjas camaronícolas del noroeste de México" 32501-T

## AGRADECIMIENTOS

A Dios, por darme la oportunidad de terminar esta tesis y por lo bien que me ha ido en la vida.

Al Maestro y mi amigo el c. Dr. Isidro Osuna López, por apoyarme en todos los aspectos en estos 10 años que tengo trabajando con él.

Al Dr. Voltolina por aceptarme como su estudiante y permitir el que aprendiera de él.

A Gloria, quien siempre estuvo a mi lado para apoyarme en lo que fuera necesario y por la paciencia que siempre me ha tenido.

Al Dr. Federico Páez y a la Dra. Ma. Esther de la Rosa, por su asesoría y sus consejos.

A mi Familia por darme todo el apoyo moral y echarme muchas porras.

A la Universidad Autónoma de Sinaloa por darme las facilidades para llevar a cabo mis estudios.

A mi amigo el c. M. en C. Gabriel López, quien siempre me ha brindado ayuda en todos los momentos. ANIMO Gabi

A M. en C. Ma. de los Angeles Herrera Vega y al Quim. Humberto Bojórquez por su asesoría técnica.

A Margarita Cordero (Magalita) por su siempre buena disposición que me mostró y la ayuda en mis trámites escolares.

A Clara Ramírez Jaugueri por conseguirme el acervo bibliográfico que necesité durante mis estudios.

Al Mat. Germán Ramírez por todo el apoyo brindado en cuestiones de computación.

Al personal del mejor laboratorio de México, el LEA: a, Gil, Héctor, Pancholín, Gabi, Isidro y Frías.

A mis estudiantes y amigos: Nohemí, Zaira, Amelia, Gerardo, Fer, Steve, Niebla, el Dr. Elizalde, Servando, Abraham, Pompeyo, Armando, *Canis sapiens*, Robert, Sámano; por sus porras y permitirme aprender de Uds.

A todos Uds. y a quien me faltó **GRACIAS**, porqué sin su ayuda no lo hubiera logrado.

A Dios  
Ami Familia  
A mis Amigos  
A todos

Y a ti Gloria.

Como lo dije en mi tesis anterior, en la vida nos topamos con todo gente buena y gente “de la patada”, pero esa gente buena con quien me he topado en la vida me ha permitido aprender de ellas, y por eso estoy muy agradecido con Dios, porque muchas de esas personas enaltecen la palabra ≡ AMISTAD ≡ y siempre estarán conmigo, porque...

...Los buenos amigos nunca se olvidan porque viven en nuestro corazón.

...Y yo te cuido mientras duermas, y tu cuando esté despierta.

### *EL CAMINO DURANTE MIS METAS*

Durante el camino de mi vida he enfrentado muchos retos, estos me han cambiado y de ellos he aprendido, transformándolos en metas. Muchas de ellas difíciles pero al lograrlas he sentido la satisfacción de superarlas; desde mi niñez he aprendido a vivir con sueños y estos verlos culminados gracias a personas que me han rodeado y ayudado a vivir cada experiencia como se vive la vida misma.

Gloria Barrón Gallardo (2002)

## Resumen

El objeto del presente estudio fue determinar la toxicidad aguda de Cd, Cu, Fe, Hg, Mn, Pb y Zn totales para postlarvas de *Litopenaeus vannamei*, utilizando agua de mar y el método estático con recambio. El incremento en la concentración redujo el tiempo de sobrevivencia. La  $CL_{50-96}$  h (concentración letal media) para Cd, Cu, Fe, Hg, Mn, Pb y Zn totales fue de 2.49, 37.3, 44.3, 1.23, 130, 134 y 2.08 mg/L, respectivamente. Todos los organismos del grupo testigo sobrevivieron en cada uno de los experimentos. El Pb resultó ser menos tóxico, mientras que el mercurio fue el de mayor toxicidad. Para cada metal, no se observó alguna correlación entre la concentración y la mortalidad de las postlarvas que alcanzaron la fase de ecdysis. Solo en el experimento con cobre se observó un incremento en la frecuencia de mudas.

Además, se evaluó la interacción entre Cd-Hg, Cd-Zn, Zn-Hg, Hg-Pb, Cu-Zn and Fe-Mn. La toxicidad de estas mezclas fue evaluada utilizando el concepto de la unidad tóxica. En las mezclas de Cd-Hg, Zn-Hg y Hg-Pb se observó un efecto de sinergismo, mientras que para las de Cd-Zn, Cu-Zn y Fe-Mn el efecto fue de antagonismo. En ninguna mezcla se observó simple aditividad. Por último, se evaluó la toxicidad de los siete metales en combinación, utilizando diferentes factores de aplicación (FA) (0.01, 0.025, 0.05 y 0.1). Solo las postlarvas expuestas a 0.01 FA no mostraron diferencias significativas en mortalidad y crecimiento con respecto a los testigos.

## Abstract

The aim of this study was to determine the acute toxicity of total Cd, Cu, Hg, Mn, Pb and Zn for *Litopenaeus vannamei* postlarvae using seawater and the static renewal method. Increased metal concentration led to reduced survival time. The  $LC_{50-96}$  h (median lethal concentration) for total Cd, Cu, Hg, Mn, Pb and Zn was 2.49, 37.3, 44.3, 1.23, 130, 134 and 2.08 mg/L, respectively. All shrimps survived in the controls of each experiment. Lead was found to be least toxic, while mercury had the higher toxicity. For each metal, no correlation was observed between the metal concentration and the mortality of the postlarvae that reached ecdysis stage. In the Cu-experiment, an increase of molting frequency was observed.

Besides, the interaction between Cd-Hg, Cd-Zn, Zn-Hg, Hg-Pb, Cu-Zn and Fe-Mn was examined. Toxicities of mixtures of metals were assessed using the toxic-unit concept. Only in Cd-Hg, Zn-Hg y Hg-Pb mixtures the effect was of synergism, while in Cd-Zn, Cu-Zn and Fe-Mn the effect was of antagonism. No simple additivity was observed in the mixtures. Finally, the toxicity of the seven metals in combination was evaluated using different application factors (AF) (0.01, 0.25, 0.05, and 0.1). Only postlarvae exposed to 0.01 (AF) showed no significant differences in mortality and growth in comparison with the controls.

## LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

- Tabla 1. Caracterización del agua utilizada en los experimentos.
- Tabla 2. Porcentaje de mortalidad de postlarvas expuestas a diferentes concentraciones de cadmio total.
- Tabla 3. Valores y límites de confianza superior e inferior de la  $CL_{50}$  de Cd total (mg/L) para postlarvas de *L. vannamei*.
- Tabla 4. Porcentaje de mortalidad de postlarvas expuestas a diferentes concentraciones de cobre total.
- Tabla 5. Valores y límites de confianza superior e inferior de la  $CL_{50}$  de Cu (mg/L) para postlarvas de *L. vannamei*.
- Tabla 6. Porcentaje de mortalidad de postlarvas expuestas a diferentes concentraciones de hierro total.
- Tabla 7. Valores y límites de confianza superior e inferior de la  $CL_{50}$  de Fe (mg/L) para postlarvas de *L. vannamei*.
- Tabla 8. Porcentaje de mortalidad de postlarvas expuestas a diferentes concentraciones de Mn total.
- Tabla 9. Valores y límites de confianza superior e inferior de la  $CL_{50}$  de Mn (mg/L) para postlarvas de *L. vannamei*.
- Tabla 10. Porcentaje de mortalidad de postlarvas expuestas a diferentes concentraciones de Hg total.
- Tabla 11. Valores y límites de confianza superior e inferior de la  $CL_{50}$  de Hg (mg/L) para postlarvas de *L. vannamei*.
- Tabla 12. Valores de Pb disuelto (mg/L) determinados por espectrofotometría de absorción atómica en las concentraciones nominales usadas (mg/L) del presente estudio.
- Tabla 13. Porcentaje de mortalidad de postlarvas expuestas a diferentes concentraciones de Pb total.
- Tabla 14. Valores y límites de confianza superior e inferior de la  $CL_{50}$  de Pb (mg/L) para postlarvas de *L. vannamei*.
- Tabla 15. Porcentaje de mortalidad de postlarvas expuestas a diferentes concentraciones de Zn total.
- Tabla 16. Valores y límites de confianza superior e inferior de la  $CL_{50}$  de Zn (mg/L) para postlarvas de *L. vannamei*.
- Tabla 17. Porcentaje de mortalidad de postlarvas (PL17) expuestas a diferentes unidades tóxicas de Cd-Hg (RT= 1:1). Entre paréntesis se presenta el número de mudas.
- Tabla 18. Valores de la  $UT_{50}$  y sus límites de confianza ( $\alpha=0.05$ ) (entre paréntesis) de postlarvas de *L. vannamei* (PL17) expuestas a la mezcla de Cd-Hg (RT= 1:1).
- Tabla 19. Porcentaje de mortalidad de postlarvas (PL17) expuestas a diferentes unidades tóxicas de Cd-Zn (RT= 1:1). Entre paréntesis se presenta el número de mudas.
- Tabla 20. Valores de la  $UT_{50}$  y sus límites de confianza ( $\alpha=0.05$ ) (entre paréntesis) de postlarvas de *L. vannamei* (PL17) expuestas a la mezcla de Cd-Zn (RT= 1:1).
- Tabla 21. Porcentaje de mortalidad de postlarvas (PL17) expuestas a diferentes unidades tóxicas de Zn-Hg (RT= 1:1). Entre paréntesis se presenta el número de mudas.
- Tabla 22. Valores de la  $UT_{50}$  y sus límites de confianza ( $\alpha=0.05$ ) (entre paréntesis) de postlarvas de *L. vannamei* (PL17) expuestas a la mezcla de Zn-Hg (RT= 1:1).
- Tabla 23. Porcentaje de mortalidad de postlarvas (PL17) expuestas a diferentes unidades tóxicas de Hg-Pb (RT= 1:1). Entre paréntesis se presenta el número de mudas.

- Tabla 24. Valores de la  $UT_{50}$  y sus límites de confianza ( $\alpha=0.05$ ) (entre paréntesis) de postlarvas de *L. vannamei* (PL17) expuestas a la mezcla de Hg-Pb (RT= 1:1).
- Tabla 25. Porcentaje de mortalidad de postlarvas (PL17) expuestas a diferentes unidades tóxicas de Cu-Zn (RT= 1:1). Entre paréntesis se presenta el número de mudas.
- Tabla 26. Valores de la  $UT_{50}$  y sus límites de confianza ( $\alpha=0.05$ ) (entre paréntesis) de postlarvas de *L. vannamei* (PL17) expuestas a la mezcla de Cu-Zn (RT= 1:1).
- Tabla 27. Porcentaje de mortalidad de postlarvas (PL17) expuestas a diferentes unidades tóxicas de Fe-Mn (RT= 1:1). Entre paréntesis se presenta el número de mudas.
- Tabla 28. Valores de la  $UT_{50}$  y sus límites de confianza ( $\alpha=0.05$ ) (entre paréntesis) de postlarvas de *L. vannamei* (PL17) expuestas a la mezcla de Fe-Mn (RT= 1:1).
- Tabla 29. Porcentaje de mortalidad de postlarvas expuestas a mezclas de Cd, Cu, Fe, Hg, Mn, Pb y Zn con diferente factor de aplicación; mudas entre paréntesis.
- Tabla 30. Consumo de alimento de las postlarvas de *L. vannamei* expuestas a los metales de manera individual a concentraciones inferiores (mg/L) a la  $CL_{50}$ -96 h. Valores máximos y mínimos de consumo (en paréntesis horas de exposición).
- Tabla 31. Consumo de alimento en postlarvas de *L. vannamei* expuestas a las mezclas de metales (1:1) a concentraciones inferiores (mg/L) a la  $UT_{50}$ -168 h. Valores máximos y mínimos (entre paréntesis horas de exposición).
- Tabla 32. Consumo de alimento en postlarvas de *L. vannamei* expuestas a las mezclas de metales (1:1) a concentraciones inferiores (mg/L) a la  $UT_{50}$ . Valores máximos y mínimos en porcentaje.
- Tabla 33. Comparación de  $CL_{50}$  de Cd en varias especies de crustáceos.
- Tabla 34. Comparación de  $CL_{50}$  de Cu obtenida en varias especies de crustáceos.
- Tabla 35. Valores de Cu disuelto (mg/L) determinados por espectrofotometría de absorción atómica en las concentraciones nominales usadas (mg/L) para el presente estudio.
- Tabla 36. Valores de Fe disuelto (mg/L) determinados por espectrofotometría de absorción atómica en las concentraciones nominales usadas (mg/L) del presente estudio.
- Tabla 37. Comparación de  $CL_{50}$  de Mn obtenida en varias especies de crustáceos.
- Tabla 38. Comparación de  $CL_{50}$  de Hg obtenida en varias especies de crustáceos.
- Tabla 39. Comparación de  $CL_{50}$  de Pb para varias especies de crustáceos.
- Tabla 40.- Comparación de  $CL_{50}$  de Zn obtenida en varias especies de crustáceos.
- Figura 1. Relación de la concentración de Cd con la mortalidad probit en postlarvas PL17 de *Litopenaeus vannamei*.
- Figura 2. Relación de la concentración de Cu con la mortalidad probit en postlarvas PL17 de *Litopenaeus vannamei*.
- Figura 3. Relación de la concentración de Fe con la mortalidad probit en postlarvas PL17 de *Litopenaeus vannamei*.
- Figura 4. Relación de la concentración de Mn con la mortalidad probit en postlarvas PL17 de *Litopenaeus vannamei*.
- Figura 5. Relación de la concentración de Hg con la mortalidad probit en postlarvas PL17 de *Litopenaeus vannamei*.
- Figura 6. Relación de la concentración de Pb con la mortalidad probit en postlarvas PL17 de *Litopenaeus vannamei*.
- Figura 7. Relación de la concentración de Zn con la mortalidad probit en postlarvas PL17 de *Litopenaeus vannamei*.



## INDICE

	página
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	6
3. OBJETIVOS	10
3.1 Objetivo general	10
3.2 Objetivos específicos	10
4. MATERIAL Y MÉTODOS	11
4.1 Pruebas de toxicidad individuales	13
4.2 Pruebas de toxicidad con mezclas	15
4.3 Pruebas de toxicidad con diferentes factores de aplicación	17
5. RESULTADOS	18
5.1 Características químicas del agua de mar	18
5.2 Pruebas de toxicidad individuales	19
5.2.1 Cadmio total	19
5.2.2 Cobre total	20
5.2.3 Hierro total	22
5.2.4 Manganeso total	24
5.2.5 Mercurio total	26
5.2.6 Plomo total	27
5.2.7 Zinc total	29
5.3 Pruebas de toxicidad con mezclas	30
5.3.1 Cd-Hg	31
5.3.2 Cd-Zn	33
5.3.3 Zn-Hg	35
5.3.4 Hg-Pb	37
5.3.5 Cu-Zn	39
5.3.6 Fe-Mn	41
5.4 Experimento con diferentes factores de aplicación	43
5.5 Consumo de alimento	46
5.5.1 Pruebas de toxicidad individuales	46
5.5.2 Pruebas de toxicidad con mezclas (RT=1:1)	48
5.5.3 Pruebas con diferente factor de aplicación	49
6. DISCUSIONES	50
6.1 Pruebas de toxicidad individuales	50
6.1.1 Cd	51
6.1.2 Cu	56
6.1.3 Fe	61
6.1.4 Mn	63
6.1.5 Hg	64
6.1.6 Pb	67
6.1.7 Zn	69
6.1.8 Orden de toxicidad	71
6.2 Pruebas de toxicidad con mezclas	74
6.2.1 Cd-Hg	74
6.2.2 Cd-Zn	75
6.2.3 Zn-Hg	76

6.2.4 Cu-Zn	77
6.3 Experimento con diferentes factores de aplicación	78
6.4 Consumo de alimento	82
6.4.1 Pruebas de toxicidad individuales	82
6.4.2 Pruebas de toxicidad con mezclas	84
7. CONCLUSIONES	86
8. LITERATURA CITADA	87
ANEXOS (Figuras y artículo científico: Frías-Espericueta <i>et al.</i> (2001)).	

## 1. INTRODUCCIÓN

Las fuentes de contaminación de los suelos y de las aguas tropicales y subtropicales se han incrementado y diversificado como consecuencia del rápido desarrollo de estas áreas, que por su clima favorecen las actividades primarias como la agroindustria, la pesca y la acuicultura, además del crecimiento de los sectores que se dedican a agregar valor a los productos de estas industrias y a comercializar bienes y servicios.

El impacto de estas actividades y del aumento paralelo de la población que se dedica a las mismas, es fuente de creciente preocupación para los sectores políticos y académicos en lo referente a la preservación del ambiente.

Existen numerosos estudios dedicados a detectar y valorar los efectos de las diferentes fuentes de contaminación, desde la eutroficación antropogénica de esteros, lagunas y estuarios (De la Lanza-Espino, 1994), al uso indiscriminado de plaguicidas (Osuna-López *et al.*, 1998) y a la acumulación en aguas y suelos de los metales pesados que tienen origen diferente, desde la industria minera a la metalmecánica, electrónica y química y los que se derivan de los plaguicidas (Villanueva y Botello, 1998).

En el caso específico de los metales pesados, en los últimos 25 años se ha dedicado gran atención a su presencia en suelos y aguas (Singh y Steinnes, 1994), debido principalmente a que las actividades antropogénicas han excedido en varios órdenes de magnitud la tasa de movilización natural de estos elementos, lo que cual tiene claras implicaciones en la contaminación de los recursos acuáticos, tanto a escala local como global (Phillips y Rainbow, 1993).

De acuerdo con Stocker y Seager (1981), 84 de los 108 elementos de la tabla periódica se clasifican como metales, por lo cual las oportunidades de contaminación metálica son numerosas; no obstante, no todos los metales representan riesgos para el ambiente puesto que algunos no son tóxicos y otros, aún cuando lo sean, son muy escasos o sus compuestos son insolubles. Por lo tanto, sólo unos pocos de ellos se consideran en la actualidad como contaminantes ambientales, aunque algunos metales tóxicos o potencialmente tóxicos son

muy abundantes en el ambiente natural como es el caso del Al, Fe, y Mn, que constituyen el 8, 5 y 0.1% de la corteza terrestre, respectivamente (Lobel *et al.*, 1991).

Una de las mayores fuentes de preocupación en lo que se refiere a la contaminación por metales pesados es que una vez introducidos al ambiente, no se degradan biológica ni químicamente, por lo que persisten en el sistema, ya que los compuestos con los cuales se asocian (i.e. materia orgánica) pueden degradarse o alterarse, pero no así los metales, los cuales solamente pueden cambiar de forma química según el pH, la temperatura, la salinidad, las condiciones redox del medio y las actividades bioquímicas, formándose en algunos casos compuestos que pueden ser todavía más tóxicos que el mismo metal (Bryan, 1976).

De acuerdo con Páez-Osuna (1996), los efectos adversos de los metales dependen de las actividades biológicas que afectan. Existe un balance muy delicado entre los organismos y el ambiente, el cual está determinado por la utilización de los metales en algunas reacciones enzimáticas celulares, y por su bioacumulación hasta niveles tóxicos lo cual causa efectos que se caracterizan, en general, como perturbaciones sobre una amplia variedad de sistemas enzimáticos en los compartimentos intracelulares. Estas manifestaciones tóxicas han sido observadas en todos los animales estudiados, incluyendo a los organismos acuáticos y al hombre mismo (Páez-Osuna, 1996).

Por lo anterior, el conocimiento del efecto tóxico de las sustancias químicas sobre la biota acuática es especialmente importante cuando se trata de resguardar las especies y los ecosistemas (Espina y Vanegas, 1996). Para poder evaluar el nivel de riesgo para el ecosistema son necesarias evidencias tanto biológicas como químicas (Cairns y Pratt, 1989), que se puedan obtener directamente a través de pruebas toxicológicas. En dichas pruebas se usan las respuestas de los organismos acuáticos para detectar y cuantificar la concentración y el efecto de una o más sustancias, desechos o factores ambientales solos o en combinación sobre un organismo determinado.

De acuerdo con APHA-AWWA-WPCF (1989) las pruebas de toxicidad son útiles para una variedad de propósitos que se refieren:

- a) a la detección de la adaptación de la vida acuática a las condiciones ambientales,
- b) para detectar los factores ambientales favorables o desfavorables,
- c) los efectos de factores ambientales sobre el grado de toxicidad de sustancias de desecho,
- d) la toxicidad de sustancias de desecho sobre los organismos de prueba,
- e) la sensibilidad relativa de los organismos acuáticos a un efluente o tóxico en particular,
- f) al tipo, grado y duración del tratamiento para el control de la contaminación de las aguas,
- g) la cantidad de efluentes descargados a un cuerpo acuático, entre otros.

La exposición a sustancias tóxicas causa estrés en los organismos, los cuales se vuelven mucho más sensibles a parásitos y enfermedades (APHA-AWWA-WPCF, 1989). Por lo tanto, las pruebas de toxicidad son necesarias para la evaluación de la contaminación del agua, debido a que las pruebas físicas y químicas por separado no son suficientes para evaluar los efectos potenciales de los tóxicos sobre la biota acuática (Tarzwell, 1971).

De acuerdo con Simkiss y Mason (1983), la vida se ha desarrollado de una manera selectiva en relación a los constituyentes químicos mayoritarios en la tierra. Estos elementos se encuentran dentro de tres grupos principales en función del uso en los procesos biológicos: seis (H, O, C, N, S y P) están incluidos en los principales componentes orgánicos de la célula, como carbohidratos, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos; y cinco (K, Ca, Na, Cl y Mg) en la composición iónica de los fluidos intra y extracelulares. Finalmente hay un gran grupo de elementos que son requeridos sólo en cantidades traza para una amplia variedad de actividades metabólicas. Algunos de éstos son metales y tienen una amplia variedad de funciones, de las cuales la actividad de metaloenzimas y el transporte de oxígeno son de las más conocidas.

En general, los metales pesados se caracterizan por su gran afinidad con el azufre, razón por la cual pueden inactivar diversas enzimas ya que se enlazan a los grupos sulfidrilos

(SH), grupos carboxilos (COOH) y aminas (NH<sub>2</sub>) de las proteínas (Espina y Vanegas, 1996). Entre las enzimas cuya actividad es alterada por la exposición a los metales pesados destacan la Na-K-ATPasa (Hansen *et al.*, 1992; Pequeux, 1995) así como la lactato deshidrogenasa, las lipasas, amilasas y proteasas del hepatopáncreas en los crustáceos, de la glándula digestiva en los moluscos y en el hígado de peces (Reddy y Fingerman, 1994).

Viarengo (1985) concluye que cuando un metal entra a la célula, este se une a componentes celulares de bajo peso molecular, la mayoría de los cuales son sustratos de actividades enzimáticas; además de unirse al glutatión (principal compuesto tiol no proteico) el cual tiene la importancia biológica, junto con el NADH y NADPH, de mantener el potencial óxido-reducción de la célula (Reed y Beatty, 1980) y que representa una forma de conjugación y desintoxicación de metales pesados en las células del hígado y del riñón (Viarengo, 1985). Según Chang y Cockerham (1994) la mayoría de las sales inorgánicas de los metales (Pb, Hg, As y Cd) son nefrotóxicas y producen daño al riñón, mientras que las formas orgánicas como metil-Hg y órgano-Pb son altamente neurotóxicos.

Bowen (1966) clasificó las metalo-enzimas en función del grupo prostético: (a) metalo-proteínas, como aquellas que no tienen grupo prostético y el metal es ligado directamente a la proteína, (b) metalo-porfirinas, en las cuales el metal es quelado por un grupo prostético porfirínico y (c) metalo-flavinas, que son las que contienen un grupo prostético flavina a la cual está unido el metal.

De acuerdo con Carvalho *et al.* (1994) y González-Farías *et al.* (1996), la aplicación de grandes cantidades de plaguicidas en las zonas agrícolas tropicales es una actividad muy común. Por ejemplo, estos autores encontraron que en las áreas agrícolas colindantes con el sistema lagunar-estuarino Altata-Ensenada del Pabellón se aplican grandes cantidades de carbamatos y organofosforados (hasta 3.3 kg/ha) y que debido a la escurrencia desde las áreas agrícolas, grandes cantidades de estos productos son descargadas rápidamente a las aguas costeras (Mee *et al.*, 1991). Ésto, además de incrementar la concentración de plaguicidas en las zonas costeras, donde se encuentran ubicados los laboratorios de producción de postlarvas y las granjas camaronícolas, tiene como consecuencia un

incremento en la concentración de algunos metales pesados, ya que estos elementos forman parte de algunos de estos agroquímicos (Forstner y Wittman, 1981).

De acuerdo con Campbell y Tessier (1991), los sedimentos actúan como un importante reservorio de metales pesados, con niveles de concentración de 1000 a 5000 veces superiores a los que se encuentran en la columna de agua (Livett, 1988). En algunas ocasiones los sedimentos liberan metales al agua suprayacente, llegando incluso a exceder los niveles de concentración de las aguas intersticiales (Carignan y Tessier, 1985; Tessier *et al.*, 1989). Ésto es de vital importancia ecológica, ya que la columna de agua funciona como hábitat de una comunidad abundante y diversa, incluyendo las postlarvas de los camarones.

Parte de la problemática de manejo y producción de postlarvas de camarón en los laboratorios comerciales del noroeste de México reside en la calidad del agua, particularmente en aquellos cuyas aguas de suministro son subterráneas y/o intersticiales. Éstas frecuentemente contienen algunos metales pesados, cuyos efectos tóxicos pueden repercutir sobre la sobrevivencia y la densidad de la población en sus diferentes estadios larvarios en los laboratorios de producción de larvas, además de juveniles y los adultos en el caso de las granjas camaronícolas.

Por este motivo, es evidente la importancia de estudiar los niveles de concentración de los metales pesados disueltos en las aguas de uso de los laboratorios y de las granjas camaronícolas y, mediante experimentos, establecer niveles de calidad del agua para el manejo y cultivo de postlarvas de *Litopenaeus vannamei*, que es la finalidad de este trabajo, en el cual se establecen las concentraciones letales de algunos metales para estos organismos y como estas pueden ser modificadas por la presencia de otros factores adversos, en este caso representados por otros metales.

## 2. ANTECEDENTES

Durante el último medio siglo se han registrado varios eventos de toxicidad por metales pesados en humanos. Entre los más conocidos destaca la enfermedad de Minamata (Japón) causada por el Hg (metil-mercurio) el cual afecta severamente el sistema nervioso central, lo que provocó que 798 personas que consumían habitualmente peces y moluscos contaminados con Hg enfermaron, y 107 de ellas perecieron (Phillips y Rainbow, 1993). Un caso similar fue observado por Bakir *et al.* (1973) los cuales mencionan que la población al norte de Irak sufrió una intoxicación masiva debido al consumo de semillas de trigo importados de México, que fueron tratados con metil-mercurio.

Hagino y Yoshioka (1961) postularon que la enfermedad "itai-itai" (por los gritos de sufrimiento por parte de las personas que la padecían) que apareció en los 60's en Japón, era debida a una intoxicación crónica por Cd. De acuerdo con Forstner y Wittman (1981) y Mance (1987), de alrededor de 200 personas que la contrajeron, 100 murieron a causa de esta enfermedad.

Aunque no relacionados con la salud pública, se han registrado casos de toxicidad aguda también para otros organismos. Por ejemplo, D'Itri (1972), observó que el Hg, utilizado en fungicidas, fue el responsable de severos daños a las poblaciones de aves en Suiza. Como estos, hay varios otros casos citados en los cuales los efectos fueron letales. Sin embargo, todos pueden ser acompañados por un número de incidencias de impactos subletales, debido a la exposición crónica de la población a bajas concentraciones de metales en su entorno (Phillips y Rainbow, 1993).

Estudios sobre la toxicodinámica y mecanismos de toxicidad de los metales pesados en organismos acuáticos han sido previamente publicados; entre los cuales podemos citar los trabajos de Bryan (1967) quien encontró diferencias funcionales en los músculos de *Homarus vulgaris*, notando que los músculos que se contraían más rápidamente tenían concentraciones de zinc más bajas que los músculos que se contraían más lentamente. Rainbow (1993) menciona que el zinc inhibe la enzima arginina-quinasa, la cual cataliza la formación de arginina-fosfato, un compuesto de elevada energía que permite la rápida refosforilación del ADP durante la contracción del músculo.



Con respecto a la toxicidad de los metales pesados, destacan los trabajos de Bryan (1976b) quien cita que el Hg es más tóxico para *Acartia* sp. que para *Artemia* sp., probablemente porque el tegumento de la segunda posee una mayor impermeabilidad que el de la primera. Madsen (1992), en un experimento con *Crangon crangon*, encontró que los organismos jóvenes son más sensibles al arsénico que los organismos adultos.

Vernberg *et al.* (1974) expusieron a *Uca pugilator* a 1.8 ppb de Hg y encontraron que el consumo de oxígeno en la zoea I disminuyó, en tanto que en la siguiente fase (zoea II) la tasa no cambió con respecto a los testigos, y Hughes (1976) señaló que el cobre, cadmio y zinc, interfieren con la captación de oxígeno al nivel branquial.

Con respecto a trabajos llevados a cabo sobre la toxicidad aguda, Hubschman (1967) señala que la concentración letal media del cobre (CL<sub>50-96 h</sub>) es de 3 mg/L en el caso de *Orconectes rusticus*; Connor (1972) y Waldichuk (1974) señalan que en el crustáceo *Crangon crangon* la CL<sub>50-48 h</sub> de Cu es 29.5 y 3.3 mg/L, respectivamente. Johns y Miller (1982) y Correa (1986) obtuvieron una CL<sub>50-96 h</sub> de Cu de 0.1 mg/L con *Cancer irroratus* y *Macrobrachium carcinus*, respectivamente; mientras que Uma-Devi y Prabhakara-Rao (1989) encontraron que para los juveniles de *Uca annulipes* y *Uca triangularis* las CL<sub>50-96 h</sub> de Cu fueron de 12.82 y 14.81 mg/L, respectivamente.

El trabajo de Thorpe y Costlow (1989) es de gran relevancia por sus posibles repercusiones ecológicas y pesqueras, ya que sus resultados se pueden relacionar con el reclutamiento de varios recursos o sobre la disponibilidad del alimento natural para los mismos. Estos autores determinaron la CL<sub>50-96 h</sub> de Cd para las siguientes especies: *Homarus americanus* (0.078 mg/L), *Cancer magister* (0.247 mg/L), *Cancer irroratus* (0.15 mg/L), *Eurytemora affinis* (0.99 mg/L) y *Paragrapsus quadridentatus* (0.62 mg/L); finalmente, para larvas de *Tisbe holothuriae*, *Portunus pelagicus*, *Portunus sanguinolentus* y *Charylodis feriatus*, las CL<sub>50-48 h</sub> fueron 0.645, 0.380, 0.250 y 0.250 mg/L, respectivamente.

En lo referente a los trabajos de toxicidad aguda de metales pesados para camarones peneidos, se pueden mencionar los de Bahner y Nimmo (1976), quienes determinaron que

la  $CL_{50-96}$  h de Cu en *Farfantepenaeus duorarum* es de 4.6 mg/L; y de Espina y Vanegas (1996), que mencionan que las  $CL_{50-96}$  h de Cd para juveniles de *Farfantepenaeus aztecus* y *Litopenaeus setiferus* son de 1.32 y 3.04 mg/L, respectivamente, entre otros.

De acuerdo con Páez-Osuna y Frías-Espericueta (2001), entre los metales que representan un mayor riesgo para la salud y que más se movilizan de manera cotidiana dado su empleo extendido, sobresalen el Pb, Hg y Cd y estos elementos son los de mayor prioridad para la EPA (1991). Así mismo, las aguas municipales y la producción de fertilizantes constituyen una considerable fuente antropogénica de Fe, Mn y Zn, entre otros (Páez-Osuna, 1996), aunado al alto uso de compuestos de Cu como algicida en las granjas camaronícolas del Noroeste de México.

Las concentraciones naturales tanto en el agua de ríos y del mar se encuentran enlistadas en numerosos textos (e.g. Bruland, 1983; Millero, 1996). Desafortunadamente, es muy escasa la información disponible respecto a los niveles de concentración de metales pesados en las aguas tanto riverinas como lagunares y costeras, zonas donde se localizan la mayoría de las laboratorios de producción de larvas y granjas camaronícolas.

No obstante, Páez-Osuna y Frías-Espericueta (2001) resumen el intervalo de concentración de metales pesados disueltos en las aguas de diferentes lagunas costeras de México. En dicha revisión Cu, Cd, Zn, Pb y Fe oscilan entre 0.3-2.8, 0.1-29.3, 1.7-111, 0.1-69.1 y 1-46  $\mu\text{g/l}$ , respectivamente. Con respecto al Mn, Astorga-Castro (en prep.) determinó valores de hasta 70  $\mu\text{g/l}$  en efluentes de granjas camaronícolas ubicadas en la región de Guasave, Sinaloa.

Por lo anterior y debido a la gran importancia comercial del recurso camarón, se requieren estudios de toxicidad aguda por metales pesados en los primeros estadios larvarios de las varias especies de peneidos y en especial de *Litopenaeus vannamei* que actualmente es la más utilizada en la camaronicultura en México, ya que estos estadios son más sensibles a tóxicos que los adultos.

Además, por el incremento gradual en el nivel de concentración de los metales en los sedimentos y en la columna de agua de ríos, estuarios, esteros y de la zona costera en general, y al hecho que los laboratorios y granjas camaronícolas están localizados en la zona costera, éstos pueden experimentar los efectos de los metales pesados, lo que puede repercutir de una manera negativa en la sobrevivencia y en el desarrollo fisiológico de las larvas de *L. vannamei*, con las consiguientes pérdidas económicas para una actividad comercial que actualmente ha tomado mucho auge en nuestro país.

Es por lo anterior que se consideró importante el determinar el nivel de toxicidad de los metales pesados totales Cd, Cu, Fe, Mn, Pb, Zn y Hg para postlarvas de *Litopenaeus vannamei* de manera individual y observar como esta toxicidad es modificada al combinar los metales, así como algunos efectos que tienen estos metales a diferentes concentraciones sobre estos organismos en la fase de ecdysis y sobre el consumo de alimento.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo general

Obtener la concentración letal media individual de siete metales pesados (Cd, Cu, Fe, Hg, Mn, Pb y Zn) y de la combinación de algunos de ellos para postlarvas de *Litopenaeus vannamei*, y de esta forma conocer la capacidad de tolerancia a través de la evaluación de la sobrevivencia y del consumo de alimento.

#### 3.2.- Objetivos específicos

- Obtener la concentración letal media a las 24, 48, 72 y 96 horas de la exposición individual a cadmio, cobre, hierro, mercurio, manganeso, plomo y zinc, y con base en estos resultados estimar el nivel de toxicidad de cada uno de estos elementos en postlarvas de *Litopenaeus vannamei*.
- Obtener la concentración letal media a las 24, 48, 72, y 96 horas de exposición de las mezclas (1:1, unidades tóxicas) de Cd-Zn, Cu-Zn, Zn-Hg, Cd-Hg, Hg-Pb y Fe-Mn, y determinar si existe un efecto antagónico, sinérgico o aditivo de las mismas.
- Conocer el efecto de proceso de ecdysis en la sensibilidad de las postlarvas de *L. vannamei* expuestas a metales pesados solos o en combinación.
- Determinar si existe algún efecto agudo de la mezcla de todos los metales en concentraciones iguales a los niveles permisibles de cada uno sobre las postlarvas de *L. vannamei*.
- Determinar el efecto a diferentes niveles de concentración de Cd, Cu, Fe, Mn, Hg, Pb y Zn sobre el consumo de alimento de postlarvas de *Litopenaeus vannamei*.
- Determinar la resistencia fisiológica de las postlarvas de *Litopenaeus vannamei* en comparación con otras especies de decápodos.
- Establecer el nivel de toxicidad de estos metales pesados y con base en ello sugerir niveles de calidad del agua adecuados para la sobrevivencia de postlarvas de *Litopenaeus vannamei* en sistemas de cultivo o en el medio natural.

#### 4. MATERIAL Y MÉTODOS

De acuerdo con APHA-AWWA-WPFC (1989), el protocolo para pruebas de toxicidad debe considerar todos los aspectos del experimento que pueden afectar la calidad de los datos obtenidos. Ésto comprende el muestreo y manejo de los organismos, así como el origen y condición de los mismos y los procedimientos de prueba. De aquí la importancia de realizar los experimentos con base en estrategias y metodologías previamente probadas y es por esto que los experimentos se llevaron a cabo con base en protocolos ya establecidos y descritos, por ejemplo, en los trabajos de Chin y Chen (1987), Chen y Chin (1989), Frías-Espericueta *et al.* (1999, 2001).

Se llevaron a cabo siete experimentos para los metales individuales y seis para las siguientes mezclas (1:1) (Cd-Zn, Cu-Zn, Zn-Hg, Cd-Hg, Pb-Hg, y Fe-Mn) y uno más con la combinación de los siete metales utilizando diversos factores de aplicación, (0.1, 0.05, 0.025 y 0.01). De acuerdo con Cairns y Pratt (1989) uno de los principales problemas del uso de experimentos es la variabilidad de los datos obtenidos; para resolver esto, cada experimento (individual y combinado) se realizó con concentraciones diferentes de cada uno de los elementos a trabajar en tiempos diferentes, es decir, para completar un experimento se requirieron de 8 a 10 grupos de organismos obtenidos con reproductores diferentes (Kraus *et al.*, 1988), lo que permitió obtener un valor de la concentración letal media (CL<sub>50</sub>) para cada metal más representativo para las postlarvas de *Litopenaeus vannamei*.

Esta especie de invertebrado fue seleccionada como organismo de prueba por su gran importancia comercial en la camaronicultura del país, por su amplia distribución en el Noroeste de México, por su habilidad para adaptarse a condiciones de laboratorio y porque existe información sobre algunos aspectos biológicos.

Cada 21-30 días se realizó un viaje a un laboratorio de producción de larvas (en función de sus ciclos de producción) para obtener los organismos de prueba (500 postlarvas por experimento); dichos laboratorios se localizan a distancias relativamente cortas de

Mazatlán, Sinaloa (40-120 km), que minimizó el estrés de los organismos durante el transporte.

Las postlarvas se transportaron al Laboratorio de Microalgas de la Facultad de Ciencias del Mar de la Universidad Autónoma de Sinaloa, donde se colocaron en un recipiente de plástico previamente lavado con ácido clorhídrico (2M) y ácido nítrico (2M) y desinfectado con hipoclorito, en el cual se mantuvieron durante tres días para su aclimatación. Cada 24 horas se efectuó un recambio de agua (90-95%), y los camarones se alimentaron *ad libitum* dos veces al día con nauplios de *Artemia* sp.

Posteriormente, las postlarvas se trasladaron a vasos de precipitado de vidrio (600 ml) colocando 10 organismos por recipiente en 300 ml de agua, los cuales fueron aireados constantemente y se les alimentó de la misma manera que en el período anterior. Cada 24 h se recambió el agua y las postlarvas se mantuvieron por tres días en esta condición antes de iniciar la fase experimental, para reducir los efectos del estrés ocasionado por la transferencia y la manipulación (Allan *et al.*, 1990).

El agua de mar utilizada en los bioensayos fue bombeada directamente de la zona costera aledaña al laboratorio de Microalgas de la Universidad, la cual fue filtrada mediante un sistema de filtros de 10 a 1  $\mu\text{m}$ , y finalmente tratada con carbono activado. Para conocer su composición química y verificar que la mortalidad que se presentó en los experimentos se debió exclusivamente a los metales pesados agregados, el agua utilizada se caracterizó periódicamente mediante los análisis y métodos siguientes: salinidad mediante un refractómetro, pH mediante un potenciómetro, alcalinidad por titulación potenciométrica (Culberson *et al.*, 1969), amonio por colorimetría (Solorzano, 1969), nitritos, nitratos y fosfatos por colorimetría (Strickland y Parsons, 1972). Además se cuantificaron los niveles de concentración de metales pesados Cd, Cu, Fe, Mn, Pb y Zn por espectrofotometría de absorción atómica, después de filtrar 10 litros de agua a través de membranas de nitrocelulosa MILLIPORE tipo HA de 0.45  $\mu\text{m}$  de abertura de poro (Osuna-López *et al.*, 1989).

Para la determinación de los metales en la fracción disuelta, éstos fueron preconcentrados al hacer fluir la muestra (2-5 ml/min, regulada con una bomba peristáltica) a través de una columna de vidrio cromatográfica empacada con resina de intercambio catiónico (Chelex 100) y una vez que toda la muestra fluyó por la resina, ésta fue eluída con  $\text{HNO}_3$  2M (Bruland *et al.*, 1979). Posteriormente el eluato se concentró a sequedad ( $90^\circ\text{C}$ ) y los metales puestos en disolución con  $\text{HNO}_3$  2M para su cuantificación por espectrofotometría de absorción atómica.

#### 4.1 Pruebas de toxicidad individuales

Como se comentó anteriormente, los organismos fueron colocados en vasos de precipitados de 600 ml (de vidrio), cada uno con 10 postlarvas PL17 y 300 ml de la solución de prueba. Los experimentos se llevaron a cabo con 7-9 concentraciones diferentes y con un testigo para cada metal y cada experimento. Las pruebas con cada concentración y con el relativo testigo se realizaron por triplicado en todos los casos.

Las concentraciones para cada bioensayo se prepararon de la siguiente manera: sobre papel PARAFILM se pesó en una balanza digital, la cantidad de sal requerida para formar una solución madre de 1 mg/ml para cada metal, que se disolvió en un matraz de aforo de 1000 ml con la ayuda de un agitador magnético. Todas las sales utilizadas ( $\text{CdCl}_2$ ,  $\text{CuCl}_2$ ,  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{HgCl}_2$ ,  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{PbCl}_2$  y  $\text{ZnCl}_2$ ) fueron de grado reactivo.

Después se colocaron en un matraz de Erlenmeyer de 2000 ml las cantidades necesarias de la solución madre (1mg/ml) con micropipetas para obtener la concentración requerida y se añadieron 1,500 ml de agua mar previamente filtrada. Este procedimiento se repitió para las concentraciones de cada experimento. Esta solución de prueba se colocó en los tres recipientes (por triplicado) con la concentración correspondiente, y finalmente se inició el experimento, con duración de 96 h.

Cada 24 h se midieron la temperatura, el oxígeno disuelto y el pH y se realizó un recambio de agua (aprox. 95%) de acuerdo al método estático para pruebas de toxicidad descrito por Buikema *et al.* (1982). Para prevenir la pérdida de postlarvas durante el recambio, el agua

fue retirada mediante una débil succión con mangueras, la cual se encontraba cubierta de una malla fina (Kraus *et al.*, 1988; Wong *et al.*, 1993).

Así mismo, cada 12 horas se observaron los organismos para determinar su comportamiento y la mortalidad, y de acuerdo con Ahsanullah *et al.* (1981), los organismos muertos fueron retirados en cada observación. Se consideró que una postlarva estaba muerta cuando no reaccionó al contacto de una vara de vidrio (Chen y Chin, 1987; Frías-Espericueta *et al.*, 2001).

El cálculo de la concentración letal media (CL<sub>50</sub>) fue estimado por análisis paramétrico Probit (Rand, 1980; APHA-AWWA-WPCF, 1989), el cual se realizó con un programa de computo. Dicho programa genera una línea de ajuste óptima entre el logaritmo de las concentraciones probadas y el porcentaje de mortalidad o mortalidad Probit, que a su vez calcula la concentración que causa el 50% de mortalidad para un tiempo dado (24, 48, 72, 96 horas de exposición al tóxico), así como la normalidad de los datos y los límites de confianza al 95% (Finney, 1971).

Para establecer si dos CL<sub>50</sub> son estadísticamente diferentes ( $p = 0.05$ ), se llevó a cabo una prueba de comparación entre estas (prueba z) por el método proporcionado por APHA-AWWA-WPCF (1992).

Durante las pruebas de toxicidad, la evaluación del consumo de alimento se llevó a cabo mediante el método propuesto por Frías-Espericueta *et al.* (2000): después del recambio de agua se colocaron 200 nauplios de *Artemia* sp. en cada recipiente y los nauplios restantes se cuantificaron antes del siguiente recambio en muestras de 5 ml de la solución por recipiente, y observando el número de nauplios/ml y de esta forma se extrapolaron el total de nauplios en los recipientes. Por diferencia se obtuvo el consumo total y el consumo individual se calculó considerando las postlarvas sobrevivientes.



## 4.2 Pruebas de Toxicidad con mezclas

De acuerdo con Stromgren (1980), los efectos tóxicos de los metales, se verifican normalmente mediante experimentos que consideran solamente la toxicidad de un solo metal. Sin embargo, en la naturaleza los organismos están expuestos a una mezcla de muchos elementos y en particular existe poca información sobre el efecto de combinaciones de dos o más metales.

Por este motivo, predecir una respuesta con base en pruebas con metales individuales puede llevar a decisiones equivocadas (Negilski *et al.*, 1981), ya que la toxicidad de mezclas de sustancias tóxicas puede diferir de la simple suma del efecto tóxico de sus componentes, debido a las interacciones de sinergismo y antagonismo, de acuerdo a las cuales una combinación de metales puede resultar en aumento o disminución de la toxicidad individual, que se puede reconocer analizando los resultados de pruebas diseñadas con esta finalidad (Vermeulen, 1995).

Se llevaron a cabo seis pruebas de toxicidad de las mezclas de dos metales, considerando una razón de toxicidad de 1:1 en cada caso. Tanto la razón de toxicidad como las unidades tóxicas se calcularon de acuerdo a la fórmula descrita por Lloyd (1961), Sprague y Ramsay (1965), Chen y Chin (1988) y Vanegas *et al.* (1997):

$$RT = (M_1\text{-Nom}) / (LC_{50} M_1) : (M_2\text{-Nom}) / (LC_{50} M_2)$$

$$UT = (M_1\text{-Nom}) / (LC_{50} M_1) + (M_2\text{-Nom}) / (LC_{50} M_2)$$

Donde.

RT= razón de toxicidad

UT= unidad de toxicidad

$M_1\text{-Nom}$ ,  $M_2\text{-Nom}$  = concentración nominal de cada uno de los metales en sus respectivas soluciones.

$LC_{50} M_1$  ,  $LC_{50} M_2$  = valor de la  $LC_{50}$ -96 h de cada metal cuando las postlarvas fueron expuestas a los bioensayos individuales.

$M_1$  = metal uno

M<sub>2</sub> = metal dos

Ahsanullah *et al.* (1981) sugirieron que para ciertos tóxicos, entre ellos los metales, los experimentos de 96 h son demasiados cortos para determinar adecuadamente los efectos tóxicos del elemento, pero son necesarios para obtener los valores de seguridad y además, para el cálculo de las unidades tóxicas (UT) utilizadas en los bioensayos de las mezclas.

Se trabajaron diferentes concentraciones (equivalentes a diferentes UT) en función de las respuestas que se fueron obteniendo; el intervalo de unidades tóxicas (UT) varió de 0.05 hasta 10. Como en los bioensayos individuales, éstos también se hicieron por triplicado y con su respectivo control, igualmente por triplicado. En general, toda la metodología durante el bioensayo de las mezclas fue similar a las pruebas de toxicidad individual, con la diferencia que el bioensayo con las mezclas tuvo una duración de 168 h de exposición continua.

Las pruebas de toxicidad conjunta se llevaron a cabo con mezclas de los siguientes metales: Cd-Zn, Zn-Cu, Zn-Hg, Cd-Hg, Hg-Pb y Fe-Mn. Para verificar la existencia de interacción entre la toxicidad de los dos metales, se calculó la toxicidad de las mezclas de dos metales por medio de las sumas de las unidades tóxicas de cada uno de los metales (Ward y Parrish, 1982; Vermeulen, 1995).

De acuerdo con Sprague (1970), Marking (1985), Chen y Chin (1988) y Vanegas *et al.* (1997), si en un ensayo se observa una respuesta mayor que la esperada de los organismos de prueba cuando éstos son expuestos a una unidad tóxica (UT) menor a 1, el tipo de interacción de los componentes es sinérgica, cuando es igual a 1 UT es estrictamente aditiva, y si no se observan respuestas o éstas son menores que la esperada cuando la UT es mayor a 1, el efecto es antagónico.

Para corroborar el efecto de la mezcla sobre los organismos de prueba, se llevó a cabo una prueba de independencia (chi cuadrada) (Sokal y Rohlf, 1979).

### **4.3 Prueba de toxicidad con diferentes factores de aplicación**

Este bioensayo consistió en la combinación de los siete metales en cuestión (Cd, Cu, Fe, Hg, Mn, Pb y Zn), el cual tuvo una duración de 21 días. En este experimento también se utilizaron 10 postlarvas PL17 por cada recipiente y se utilizó el mismo método estático, con recambios diarios de las soluciones de prueba (Buikema *et al.*, 1982).

En general, todos los procedimientos de aclimatación, mantenimiento, alimentación, toma de parámetros y observaciones fueron las mismas que los bioensayos anteriores.

Para el cálculo de las concentraciones de cada metal de la muestra, se utilizó la  $LC_{50-96}$  h de cada uno de los metales probados en los experimentos individuales. Estos valores se multiplicó por el factor de aplicación de 0.1, y de esta manera se obtuvo una concentración de cada uno de los siete metales, las cuales se combinaron en un vaso de precipitados de 1500 ml y se agregó agua de mar hasta obtener el volumen deseado y de esta forma obtener la solución de prueba. Este mismo procedimiento se repitió con los factores de aplicación de 0.05, 0.025 y 0.01. Dichas soluciones de prueba y los testigos también se trabajaron por triplicado.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Características químicas del agua de mar

Los valores de las diferentes características químicas del agua usada en este trabajo se encuentran en el intervalo considerado normal para agua de mar (APHA-AWWA-WPCF, 1992). En especial, en lo que se refiere a la concentración de metales pesados, todos los valores se encuentran en niveles de por lo menos un orden de magnitud inferiores a los de la menor concentración que se utilizó en los experimentos (Tabla 1), por lo cual se deduce que los efectos tóxicos registrados en el presente estudio se debieron exclusivamente al metal añadido o a los metales añadidos a los recipientes de prueba.

**Tabla 1.** Caracterización del agua utilizada en los experimentos. En el caso de los metales, se dan los intervalos de las concentraciones de agua usada en los testigos ( $\mu\text{g/L}$ ) (disueltos) y los de las concentraciones nominales usadas en las pruebas ( $\text{mg/L}$ ). N.A.= no analizado.

Variable	Testigos	Concentraciones nominales
Alcalinidad total: 2.12-2.15 meq/l	Cd: 0.3-0.4	1-25
pH: 8-8.1	Cu: 8-13	12-128
Amonio-N: 9-13 $\mu\text{g/l}$	Fe: 1.6-2.9	30-80
Nitrito-N: 4-5.3 $\mu\text{g/l}$	Mn: 1.5-2.3	50-350
Nitrato-N: 222-284 $\mu\text{g/l}$	Pb: 1.1-1.3	60-350
Fosfato-P: 70-83 $\mu\text{g/l}$	Hg: N.A.	0.5-3
Salinidad: 34-36 ‰	Zn: 6.7-8.5	1-30

Algunos factores ambientales como la temperatura, la salinidad y el pH del agua, pueden tener un marcado efecto sobre los valores de la  $CL_{50}$  en determinadas pruebas de toxicidad (McLeese, 1974). Por ejemplo, McLusky y Hagerman (1987) observaron que al variar significativamente estos parámetros, los tiempos de sobrevivencia del crustáceo *Praunus flexuosus* eran alterados. Notaron además que la máxima toxicidad de algunos metales ocurre a altas temperaturas y a bajas salinidades y que disminuye en forma paralela con la disminución y aumento de estas variables, aunque esto depende en gran medida de que tanto se aleje la salinidad del punto isosmótico (Pequeux, 1995); esta misma situación ocurre para varios invertebrados acuáticos (McLusky *et al.*, 1986), por lo cual es importante

mantener relativamente constantes las características ambientales cuando se lleva a cabo este tipo de pruebas.

Por este motivo, es relevante resaltar que durante los experimentos la salinidad y el pH se mantuvieron dentro de un intervalo restringido y que la temperatura tuvo una variación limitada a poco más de 2 a 3°C; mientras que el valor promedio del oxígeno disuelto fue de  $5.49 \pm 0.34$  mg/L.

## 5.2 Pruebas de toxicidad individuales

### 5.2.1 Cadmio total

En el presente estudio, el 100 % de mortalidad se observó solamente en los organismos expuestos a 15, 20 y 25 mg/L, a 96, 72 y 12 h de exposición al tóxico, respectivamente, mientras que con las concentraciones de 1, 2.5, 5 y 10 mg/L, las mortalidades obtenidas a 96 h de exposición al cadmio fueron de 20, 56.6, 60 y 93.3 %, en este orden (Tabla 2).

**Tabla 2.** Porcentaje de mortalidad de postlarvas expuestas a diferentes concentraciones de cadmio total (mg/L). Entre paréntesis se presenta el número de mudas.

Tiempo (h)	Concentración (mg/L)							
	Testigo	1	2.5	5	10	15	20	25
12	0 (2)	0	6.6 (1)	6.6	16.6 (3)	20 (4)	40	100
24	0 (4)	0	6.6	16.6 (2)	36.6	50	70 (2)	
36	0 (1)	0	16.6 (3)	20 (4)	36.6 (1)	50 (1)	70	
48	0	0 (1)	23.3 (2)	33.3 (4)	56.6	70	73.3	
60	0 (3)	13.3 (1)	23.3	36.6	76.6	83.3	86.6	
72	0	13.3	33.3 (3)	36.6	83.3 (1)	93.3 (1)	100	
84	0 (2)	20	36.6 (1)	36.6	86.6	93.3		
96	0 (3)	20	56.6 (5)	60 (1)	93.3	100		
$\Sigma$ mudas	15	2	15	11	5	6	2	0

De acuerdo con Bodar *et al.* (1990), cuando los crustáceos son expuestos a metales pesados, sus respuestas fisiológicas y metabólicas parecen estar fuertemente afectadas por el ciclo de muda. Por lo anterior, era importante observar si alguna postlarva alcanzó la fase de ecdysis durante los experimentos, ya que en esta fase, por la incorporación de agua, se facilitaría la entrada del tóxico al cuerpo del organismo. En este aspecto, no se observó una relación entre el número de exuvias y la mortalidad, con la excepción de los organismos expuestos a 2.5 mg/L, en la cual, de las 17 postlarvas que murieron, 15 se encontraban en el estadio de ecdysis.

Con los resultados de estas pruebas, los valores que se calcularon para la CL<sub>50</sub>-96 h, con sus respectivos límites de confianza (95 %) para 24, 48, 72 y 96 horas, fueron significativamente diferentes y demuestran que el 50 % de una población de postlarvas de *L. vannamei* no sobreviviría 24 horas de exposición a 11.46 mg/L de Cd, con iguales porcentajes de mortalidad para valores progresivamente más bajos, hasta 2.49 mg/L (CL<sub>50</sub>-96 h) si la exposición durara un total de cuatro días (Tabla 3).

**Tabla 3.** Valores y límites de confianza superior e inferior de la CL<sub>50</sub> de Cd total (mg/L) para postlarvas de *L. vannamei*. Letras diferentes indican diferencias significativas (prueba z : APHA-AWWA-WPCF, 1992;  $\alpha= 0.05$ ). a>b>c>d.

Hora	CL <sub>50</sub>	Lim. Sup.	Lim. Inf.
24	11.46 a	13.67	9.57
48	7.52 b	9.27	5.99
72	4.08 c	5.09	3.17
96	2.49 d	3.20	1.83

### 5.2.2 Cobre total

La aplicación de CuSO<sub>4</sub> en los estanques de cultivo de camarón es una práctica común en la camaronicultura, que tiene la finalidad de reducir la excesiva abundancia de micro y macro algas. Esto puede resultar en un excesivo incremento de este elemento en el agua, hasta alcanzar niveles de toxicidad (Chen y Lin, 2001), motivo por el cual es importante verificar el nivel de concentración ambiental y el grado de toxicidad de este elemento.

Los porcentajes de mortalidad de las postlarvas expuestas a diferentes concentraciones de cobre total (12, 16, 32, 48, 64, 80, 96, 112 y 128) se muestran en la tabla 4. El 100 % de mortalidad sólo se observó en los organismos expuestos a 128, 112 y 96 mg/L en 24, 48 y 72 h, respectivamente, mientras que en las concentraciones de 12, 16, 32, 48, 64 y 80 mg/L, las mortalidades obtenidas a 96 h de exposición al cobre fueron de 0, 20, 43.3, 56.6, 70 y 86.6 %, en el orden.

Al comparar el número de mudas en los organismos expuestos a 12 y 80 mg/l, en la primera se observaron 32 exuvias (32 organismos que alcanzaron la fase de ecdysis) mientras que en la segunda sólo se encontró evidencia de siete mudas. Aparentemente, concentraciones subletales de Cu aceleran el ciclo de muda de las postlarvas, puesto que en ningún otro experimento (Cd, Fe, Mn, Hg, Pb, Zn) se observaron tantas exuvias, cuyo número fue inclusive mayor que para los organismos que alcanzaron la fase de ecdysis en el testigo (19 exuvias).

**Tabla 4.** Porcentaje de mortalidad de postlarvas expuestas a diferentes concentraciones de cobre total (mg/L). Entre paréntesis se presenta el número de mudas.

Tiempo (h)	Concentración (mg/L)									
	Testigo	12	16	32	48	64	80	96	112	128
12	0 (3)	0	0	0	3.3 (4)	6.6 (2)	6.6 (2)	16.6	33.3 (1)	40 (2)
24	0 (2)	0 (3)	0	3.3	10 (3)	20 (1)	33.3 (3)	50 (3)	70	100
36	0 (4)	0 (2)	3.3 (1)	10 (1)	16.6 (1)	20 (1)	53.3 (1)	70 (3)	73.3	
48	0 (3)	0 (4)	3.3 (4)	13.3 (3)	33.3	53.3	70	83.3	100	
60	0 (1)	0 (9)	6.6 (3)	26.6 (3)	36.6	53.3	73.3	83.3 (2)		
72	0 (3)	0 (3)	10 (4)	26.6	40 (2)	63.3	83.3	100 (2)		
84	0 (2)	0 (6)	13.3 (3)	26.6 (4)	56.6	63.3 (1)	83.3			
96	0 (1)	0 (5)	20 (3)	43.3 (3)	56.6	70	86.6 (1)			
Σ mudas	19	32	18	14	10	5	7	10	1	2

A pesar del gran número de mudas, a 96 h de exposición con 12 mg/L de Cu no se apreció ningún efecto letal; no así en los recipientes con las postlarvas expuestas a 32 mg/L, donde murieron 13 de las 14 postlarvas que alcanzaron el estadio de ecdysis y no se observó ningún tipo de relación en el resto de las concentraciones usadas en este trabajo.

A partir de estos resultados, es evidente que se requiere estudiar con mayor detalle el posible efecto del Cu sobre el ciclo de muda de las postlarvas expuestas a niveles subletales de este elemento, puesto que a diferencia del Cd, Hg y Zn, los cuales son eliminados con el exoesqueleto durante la ecdysis, solo una pequeña parte del Cu es eliminado por esta vía, indicando una conservación del Cu a través del ciclo de muda, el cual puede ser utilizado para la síntesis de hemocianina (Engel, 1987).

Los valores de la  $CL_{50}$  en las postlarvas de *L. vannamei* para 24, 48, 72 y 96 h, con sus respectivos intervalos de confianza se presentan en la tabla 5. Dichos valores oscilaron entre 86.4 y 37.3 mg/L, lo cual indica que con estas concentraciones el 50% de una población de postlarvas de *L. vannamei* no sobreviviría a 24 y 96 h, respectivamente; si estuviera a una salinidad de 35 ‰. La misma tabla demuestra que las diferencias entre cada una de las  $CL_{50}$  fueron estadísticamente significativas.

**Tabla 5.** Valores y límites de confianza superior e inferior de la  $CL_{50}$  de Cu (mg/L) para postlarvas de *L. vannamei*. Letras diferentes indican diferencias significativas (prueba z : APHA-AWWA-WPCF, 1992;  $\alpha = 0.05$ ). a>b>c>d.

Hora	$CL_{50}$	Lim. Sup.	Lim. Inf.
24	86.4 a	94.1	79.4
48	56.8 b	63.2	50.5
72	46.1 c	52.3	40.2
96	37.3 d	42.9	32

### 5.2.3 Hierro total

El primer efecto letal de este elemento se observó a las 12 h después del inicio del experimento en las concentraciones de 55 a 80 mg/L, con porcentajes de mortalidad que aumentaron progresivamente desde el 6.6 hasta el 100 %, respectivamente; mientras que en



las concentraciones menores (30, 40, 45 y 50 mg/L) se tuvo una mortalidad inicial del 0 %. Además, el 100 % de mortalidad se observó solamente a partir de 55 mg /L (a las 84 h) y en tiempos menores para las demás concentraciones hasta la más elevada. Con 50 mg/L, se superó el 50 % de mortalidad a las 60 h, con una sobrevivencia final de 6.7 %; con las demás, las mortalidades registradas fueron del 0, 23.3 y 40 %, para 30, 40 y 45 mg/L, respectivamente (Tabla 6).

**Tabla 6.-** Porcentaje de mortalidad de postlarvas expuestas a diferentes concentraciones de hierro total (mg/L). Entre paréntesis se presenta el número de mudas.

Tiempo (h)	Concentración (mg/L)									
	Testigo	30	40	45	50	55	60	65	70	80
12	0 (3)	0	0	0	0	6.6	16.6	26.6	33.3	100
24	0 (2)	0	0 (1)	0 (1)	13.3 (4)	13.3	40 (1)	46.6 (1)	60 (2)	
36	0 (4)	0	0 (1)	0	36.6 (2)	43.3 (1)	86.6 (2)	93.3 (2)	100	
48	0 (3)	0 (5)	0 (7)	0 (1)	43.3 (3)	63.3	90 (2)	100		
60	0 (1)	0 (1)	6.6 (2)	20 (3)	60 (1)	86.6 (1)	100 (3)			
72	0 (3)	0 (1)	16.6 (1)	20	76.6 (1)	93.3 (1)				
84	0 (2)	0	16.6	23.3 (1)	86.6 (2)	100				
96	0 (1)	0 (4)	23.3 (1)	40	93.3					
Σ mudas	18	11	13	6	13	3	8	3	2	0

En ningún caso se observó una relación entre la mortalidad y el número de mudas, por lo cual se puede pensar que el efecto tóxico de este elemento no se debe a su absorción masiva durante la ecdysis y pudiera estar más bien relacionado con una acumulación progresiva, que explicaría la regularidad del incremento de la mortalidad que se hace evidente en la tabla que muestra los resultados de estos experimentos.

Los valores de las CL<sub>50</sub> que se dan con sus respectivos intervalos de confianza, indican que 63.3 y 44.26 mg/L provocarían un efecto letal en postlarvas de *L. vannamei* expuestas a 24

y 96 h, respectivamente. Con respecto al análisis estadístico entre cada una de las  $CL_{50}$ , este reveló que todas las diferencias fueron estadísticamente significativas (Tabla 7).

**Tabla 7.-** Valores y límites de confianza superior e inferior de la  $CL_{50}$  de Fe (mg/L) para postlarvas de *L. vannamei*. Letras diferentes indican diferencias significativas (prueba z : APHA-AWWA-WPCF, 1992;  $\alpha= 0.05$ ).  $a>b>c>d$ .

Hora	$CL_{50}$	Lim. Sup.	Lim. Inf.
24	63.3 a	65.9	61.1
48	52.5 b	53.8	51.1
72	46.7 c	48.1	45.2
96	44.3 d	45.6	42.8

#### 5.2.4 Manganeso total

Para las postlarvas de *L. vannamei*, mortalidades superiores al 50 % se observaron solamente para concentraciones de 150 mg/L en adelante, hasta un máximo del 100 % a las 24, 48, y 72 horas para los organismos expuestos a 350, 300 y 250 mg/L, respectivamente. Con 50 mg/L la sobrevivencia fue del 100 % hasta el final del experimento (96 h), mientras que con 100 mg/L fue superior al 70 % y el primer efecto negativo se notó solamente después de dos días. Mientras que con 150 y 200 mg/L los valores finales fueron del 60 y 86.6 % de mortalidad, respectivamente (Tabla 8).

Resalta la observación de que en presencia de 50 mg/L de Mn total, el 80 % de los organismos expuestos alcanzaron el estadio de ecdysis, y este nivel de concentración no provocó la muerte de ninguna de las postlarvas. Incluso con 100 mg/L, el 10 % de las postlarvas alcanzaron la fase de ecdysis durante las primeras 24 h de exposición y más del 20 % mudó entre las 48 y las 60 h, sin que ésto tuviera algún efecto letal. De hecho, como puede apreciarse en la tabla 8, no se observó alguna relación entre el porcentaje de mortalidad y el proceso de muda.

**Tabla 8.** Porcentaje de mortalidad de postlarvas (PL17) expuestas a diferentes concentraciones de Mn total (mg/L). Entre paréntesis se presenta el número de mudas.

Tiempo (h)	Concentración (mg/L)							
	Testigo	50	100	150	200	250	300	350
12	0 (2)	0	0 (2)	0	0 (2)	6.6 (3)	10 (3)	26.6
24	0 (1)	0 (2)	0 (1)	10 (2)	20 (7)	40 (10)	70 (6)	100
36	0 (2)	0	0	20 (1)	43.3 (3)	56.6 (2)	83.3 (1)	
48	0 (3)	0 (2)	13.3	26.6 (5)	63.3 (4)	66.6 (2)	100	
60	0 (2)	0 (6)	13.3 (7)	26.6 (5)	66.6	86.6 (1)		
72	0 (3)	0 (2)	16.6	43.3	76.6	100		
84	0 (1)	0 (9)	16.6 (5)	56.6	80			
96	0 (5)	0 (3)	26.6 (2)	60	86.6			
$\Sigma$ mudas	19	24	17	13	16	18	10	0

La tabla 9 presenta los valores medios de las  $CL_{50}$  y relativos intervalos de confianza. Estos valores disminuyeron progresivamente, indicando que 246 y 130 mg/L de Mn ejercen un efecto letal en el 50 % de las postlarvas de *L. vannamei* expuestas a 24 y 96 h, respectivamente. La comparación estadística entre cada una de las  $CL_{50}$  reveló que la disminución mencionada causa diferencias estadísticamente significativas, con excepción de los valores para 72 y 96 h (Tabla 9).

**Tabla 9.-** Valores y límites de confianza superior e inferior de la  $CL_{50}$  de Mn (mg/L) para postlarvas de *L. vannamei*. Letras diferentes indican diferencias significativas (prueba z : APHA-AWWA-WPCF, 1992;  $\alpha=0.05$ ).  $a>b>c$ .

Hora	$CL_{50}$	Lim. Sup.	Lim. Inf.
24	246 a	264	229
48	178 b	196	160
72	148 c	163	134
96	130 c	144	117

### 5.2.5 Mercurio total

Las concentraciones que se probaron fueron 0.5, 1, 1.25, 1.5, 2, 2.5 y 3 mg/L (Tabla 10). En la primera no se observó mortalidad alguna durante todo el periodo del bioensayo, pese a que 6 postlarvas mudaron en el transcurso de las 96 h. Con 1, 1.25 y 1.5 mg/L se observaron mortalidades finales del 6.6, 46.6 y 96.6 %, respectivamente, y con 2, 2.5 y 3 mg/L la mortalidad fue del 100 % a las 72, 48 y 24 h, en el mismo orden.

**Tabla 10.** Porcentaje de mortalidad de postlarvas (PL17) expuestas a diferentes concentraciones de Hg total (mg/L). Entre paréntesis se presenta el número de mudas.

Tiempo (h)	Testigo	0.5	1	1.25	1.5	2	2.5	3
12	0 (2)	0	6.6 (3)	6.6 (2)	16.6 (4)	16.6 (5)	33.3 (1)	70
24	0 (4)	0	6.6 (1)	20 (3)	43.3 (6)	50 (4)	73.3 (5)	100
36	0 (1)	0	6.6 (4)	20	70 (2)	73.3 (2)	80	
48	0	0 (3)	6.6	26.6 (2)	76.6	83.3 (4)	100 (4)	
60	0 (3)	0	6.6	30 (1)	80	86.6 (1)		
72	0	0 (3)	6.6	40	90	100		
84	0 (2)	0	6.6	40	93.3			
96	0 (3)	0	6.6 (3)	46.6	96.6			
Σ mudas	15	6	11	9	12	16	10	0

Sólo en la concentración de 1.25 mg/L se pudo observar algún tipo de relación entre la toxicidad y la fase de ecdysis, ya que con esta concentración, durante las primeras 60 h de exposición, 8 de las 9 postlarvas que murieron estaban en el estadio de ecdysis.

Los valores de las  $CL_{50}$  para este elemento oscilaron entre 1.76 y 1.23 mg/L (Tabla 11) y todos los valores fueron estadísticamente diferentes ( $p < 0.05$ ), con excepción de la comparación entre la  $CL_{50}$  calculadas para las exposiciones de 72 y 96 h.

**Tabla 11.** Valores y límites de confianza superior e inferior de la CL<sub>50</sub> de Hg (mg/L) para postlarvas de *L. vannamei*. Letras diferentes indican diferencias significativas (prueba z : APHA-AWWA-WPCF, 1992;  $\alpha= 0.05$ ). a>b>c.

Hora	CL <sub>50</sub>	Lim. Sup.	Lim. Inf.
24	1.76 a	1.93	1.62
48	1.40 b	1.50	1.31
72	1.27 c	1.33	1.20
96	1.23 c	1.29	1.18

### 5.2.6 Plomo total

Byrne *et al.* (1988) concluyeron que la principal forma química del Pb en agua marina es la asociada a complejos del cloro y carbonatos con un 26 y 69 %, respectivamente; una menor proporción (4 %) está asociada a los OH<sup>-</sup> y sólo el 3 % se encuentra como ion libre. En el presente estudio, se observó una gran cantidad de precipitados del Pb, que requirió que se cuantificara la fracción disuelta para cada una de las concentraciones experimentales, las cuales variaron entre 60 y 350 mg/L en la secuencia que se presenta en la tabla 12.

**Tabla 12.** Valores de Pb disuelto (mg/L) determinados por espectrofotometría de absorción atómica en las concentraciones nominales usadas (mg/L) del presente estudio.

Concentración nominal	Pb disuelto
60	0.44
80	1.09
100	1.72
125	2.53
150	3.09
200	7.7
250	11.6
300	20.2
350	57.2

Durante las pruebas de toxicidad, solamente se observó el 100 % de mortalidad en los recipientes con 300 y 350 mg/L a las 48 y 24 h de exposición, respectivamente; mientras que en las restantes concentraciones los porcentajes de mortalidad a las 96 h disminuyeron desde el 90 hasta el 10 % en forma paralela con la disminución de la cantidad de Pb utilizada (Tabla 13).

Como con otros metales, no se observa alguna tendencia del efecto del Pb a diferentes concentraciones sobre aquellas postlarvas que alcanzaron la fase de ecdysis. Sin embargo, llama la atención que en este experimento se presentó el número más bajo de organismos que alcanzaron el estadio de ecdysis con respecto a aquellas en los testigos, en el cual se observaron 14 exuvias. Mientras que en la concentración más baja (60 mg/L), la cual tuvo una mortalidad del 10 %, sólo se observaron 7 exuvias. Por lo anterior, sería aconsejable un estudio más detallado del efecto del Pb sobre la muda de estos organismos.

**Tabla 13.** Porcentaje de mortalidad de postlarvas (PL17) expuestas a diferentes concentraciones de Pb total (mg/L). Entre paréntesis se presenta el número de mudas.

Tiempo (h)	Testigo	60	80	100	125	150	200	250	300	350
12	0 (1)	0	0	0 (1)	3.3 (1)	3.3	3.3	6.6 (2)	16.6 (1)	56.6
24	0 (2)	0 (3)	0	6.6 (2)	13.3 (1)	26.6	43.3	53.3	73.3 (5)	100
36	0 (2)	0	0 (1)	6.6 (1)	13.3	26.6	43.3	56.6	80 (3)	
48	0	3.3 (1)	13.3 (3)	13.3	20	30	46.6	66.6 (4)	100	
60	0 (3)	6.6	20	20 (1)	20	33.3	46.6 (2)	66.6		
72	0 (1)	6.6	23.3	23.3	33.3	36.6	50 (1)	70 (2)		
84	0 (3)	6.6	23.3	33.3	33.3	36.6 (2)	53.3	73.3		
96	0 (2)	10 (3)	23.3	33.3	36.6	50	66.6 (3)	90		
Σ mudas	14	7	4	5	2	2	6	8	9	0

Los valores de las  $CL_{50}$  que se resumen y se comparan en la tabla 14, variaron entre 210 y 134 mg/L para las 24 y 96 h de exposición, respectivamente. Con la excepción de los valores calculados para las 48 y 72 h, las diferencias entre las  $CL_{50}$  resultaron significativas para diferentes tiempos de exposición.

**Tabla 14.** Valores y límites de confianza superior e inferior de la CL<sub>50</sub> de Pb (mg/L) para postlarvas de *L. vannamei*. Letras diferentes indican diferencias significativas (prueba z : APHA-AWWA-WPCF, 1992;  $\alpha= 0.05$ ). a>b>c.

Hora	CL <sub>50</sub>	Lim. Sup.	Lim. Inf.
24	210 a	229	192
48	180 b	201	162
72	160 b	181	142
96	134 c	148	120

### 5.2.7 Zinc total

Los resultados de las pruebas de toxicidad aguda que se obtuvieron con las concentraciones de Zn a las que fueron sometidas las PL 17 (1, 1.5, 2.5, 5, 10, 15, 20, 25 y 30 mg/L) se presentan en la tabla 15, en la cual se puede apreciar que después de 12 h de exposición se inició a registrar un efecto tóxico a partir de 10 mg /L.

**Tabla 15.** Porcentaje de mortalidad de postlarvas (PL17) expuestas a diferentes concentraciones de Zn total (mg/L). Entre paréntesis se presenta el número de mudas.

Tiempo (h)	Testigo	1	1.5	2.5	5	10	15	20	25	30
12	0 (1)	0	0	0	0	3.3	3.3	6.6 (2)	23.3 (2)	73.3
24	0 (2)	0 (1)	3.3	6.6 (4)	6.6 (2)	13.3	16.6 (1)	20 (3)	56.6 (7)	100
36	0 (2)	0	3.3	13.3 (3)	20 (4)	20	26.6	46.6 (6)	73.3 (4)	
48	0	0 (2)	10 (1)	23.3 (3)	36.6	46.6 (8)	53.3 (4)	66.6	83.3 (2)	
60	0 (3)	0 (2)	16.6 (2)	43.3 (5)	43.3 (3)	53.3	56.6	86.6	100	
72	0 (1)	0	30	50 (2)	63.3	76.6	86.6 (6)	100		
84	0 (3)	0	30 (3)	63.3 (2)	66.6 (5)	83.3	90			
96	0 (2)	0 (1)	33.3	76.6 (4)	90	100	100			
$\Sigma$ mudas	14	6	6	23	14	8	11	11	15	0

El 100 % de mortalidad sólo ocurrió con las concentraciones de 10 mg/L o superiores y se registró a las 24 h con 30 mg/L y en tiempos progresivamente mayores a las demás concentraciones ensayadas.

Con respecto a la relación entre toxicidad y estadio de ecdysis, en los organismos expuestos a 1 mg/L se observaron un total de 6 exuvias, sin que se observara algún efecto letal, mientras que llaman la atención los resultados obtenidos con 2.5 mg/L, puesto que las 23 postlarvas que mudaron también murieron. En el resto de las concentraciones no se observó una relación evidente entre mudas y mortalidad.

La Tabla 16 indica que una población de postlarvas de *L. vannamei* sufriría una mortalidad del 50% en 24 y 96 h al ser expuesta a 22.3 y 2.1 mg/L de Zn, respectivamente. Además, el análisis de los resultados demostró que todas las diferencias entre las CL<sub>50</sub> fueron estadísticamente significativas.

**Tabla 16.-** Valores y límites de confianza superior e inferior de la CL<sub>50</sub> de Zn (mg/L) para postlarvas de *L. vannamei*. Letras diferentes indican diferencias significativas (prueba z : APHA-AWWA-WPCF, 1992;  $\alpha= 0.05$ ). a>b>c>d.

Hora	CL <sub>50</sub>	Lim. Sup.	Lim. Inf.
24	22.3 a	29.3	18.2
48	8.6 b	10.7	6.9
72	3.5 c	4.3	2.7
96	2.1 d	2.4	1.8

### 5.3 Pruebas de toxicidad con mezclas

Debido a las interacciones de sinergismo y de antagonismo, una combinación de metales puede resultar en aumento o disminución de la toxicidad individual, que se puede reconocer analizando los resultados de pruebas diseñadas con esta finalidad (Vermeulen, 1995), las cuales consisten en pruebas de toxicidad aguda usando mezclas de porcentajes predeterminados de unidades tóxicas (UT) de los dos o más metales o tóxicos estudiados.



Como se comentó en la sección de Material y métodos, todos los experimentos con mezclas de dos metales se llevaron a cabo usando una razón de toxicidad de 1:1, la cual permite cuantificar el efecto sinérgico o antagónico, aunque no es posible identificar cual elemento contribuye en mayor proporción a dicho efecto.

### 5.3.1 Cd-Hg

Como se señaló anteriormente, las  $CL_{50-96}$  h de estos metales resultaron ser 2.49 y 1.23 mg/L para Cd y Hg, respectivamente. Por consiguiente, la UT de esta mezcla se define como la suma de 1.245 y 0.615 mg/L de Cd y Hg.

Durante esta prueba, se observó el 100 % de mortalidad con 0.5, 0.75, 1, 2, 3, 4 y 8 unidades tóxicas a 72, 36, 48, 36, 36 y 36 h, respectivamente, mientras que con las fracciones menores de UT la mortalidad que se registró varió de 3.3 a 53.3 % durante las 168 h de exposición (Tabla 17).

Sobresale el hecho de que en la UT de 0.05, después de un primer episodio de baja mortalidad a las 36 h de exposición a la mezcla, la mortalidad se mantuvo constante hasta el final del experimento y fenómenos similares se notaron hasta las 0.15 UT.

En vista de los modos de acción de estos dos metales, era de esperarse un 100 % de mortalidad antes de 96 h de exposición a la mezcla con UT menores a 1. Esta prueba lo demostró, ya que el 100 % de mortalidad se registró a las 72 horas con 0.5 UT y entre las 36 y 48 horas con 0.75 y 1 UT, respectivamente; lo que se traduce como un efecto sinérgico.

Con respecto al número de postlarvas que alcanzaron la fase de ecdysis, sobresale el hecho de que un alto porcentaje de postlarvas mudaron en las primeras 12 h de exposición, que probablemente fue debido al el estrés ocasionado por la adición de la mezcla Cd-Hg.

Además, a 0.10, 0.15 y 0.25 UT (donde no se registró el 100% de mortalidad) el número de exuvias observadas fue de 17, 16 y 17, respectivamente, valores muy diferentes al de 0.05

UT, donde sólo se registraron 4 exuvias durante todo el experimento, que es notablemente inferior a las 20 mudas encontradas en los recipientes testigos.

**Tabla 17.** Porcentaje de mortalidad de postlarvas (PL17) expuestas a diferentes unidades tóxicas de Cd-Hg (RT= 1:1). Entre paréntesis se presenta el número de mudas.

Tiempo (h)	Unidad Tóxica										
	Testigo	0.05	0.10	0.15	0.25	0.50	0.75	1	2	4	8
12	0 (2)	0 (4)	0 (8)	0 (10)	0 (3)	33.3 (9)	33.3 (8)	50 (10)	30 (9)	43.3 (10)	33.3 (2)
24	0 (1)	0	3.3 (4)	6.6 (2)	10 (2)	53.3 (1)	73.3	86.6	90	66.6	60
36	0 (3)	3.3	10	13.3	30 (2)	66.6 (1)	100	90	100	100	100
48	0	3.3	10	16.6 (1)	30 (3)	70		100			
60	0 (2)	3.3	10	16.6	36.6 (3)	83.3 (1)					
72	0 (1)	3.3	10	23.3	36.6	100					
84	0 (2)	3.3	10	23.3	40						
96	0	3.3	10	23.3	43.3						
108	0 (3)	3.3	10 (1)	23.3	46.6						
120	0	3.3	10 (2)	23.3	46.6 (2)						
132	0 (1)	3.3	16.6	30	46.6						
144	0 (3)	3.3	16.6	30 (1)	53.3						
156	0	3.3	16.6 (1)	36.6	53.3 (2)						
168	0 (2)	3.3	16.6 (1)	36.6 (2)	53.3						
∑ mudas	20	4	17	16	17	12	8	10	9	10	2

De acuerdo con Pedersen y Petersen (1996) y Vanegas *et al.* (1997), si la  $UT_{50}$  (unidad tóxica que provoca la muerte del 50% de los organismos expuestos a la mezcla a un tiempo dado) es menor que la unidad (1), el efecto es sinérgico. En la tabla 18, en la cual se

presentan los valores de la  $UT_{50}$  obtenidos a diferentes tiempos, se aprecia que los tres valores son menores que la unidad (1 UT), por lo cual se deduce que el efecto es sinérgico. Además, en la misma tabla se presentan las concentraciones equivalentes de Cd y Hg en la mezcla y se observa que la concentración requerida de cada uno de los metales para causar la muerte del 50% de la población expuesta a la mezcla es un orden de magnitud inferior de la calculada para los experimentos individuales.

**Tabla 18.** Valores de la  $UT_{50}$  y sus límites de confianza ( $\alpha=0.05$ ) (entre paréntesis) de postlarvas de *L. vannamei* (PL17) expuestas a la mezcla de Cd-Hg (RT= 1:1), sus concentraciones equivalentes (nominales) y las de los experimentos individuales (mg/L).

Tiempo de exposición	$UT_{50}$ de la mezcla			$CL_{50}$ individuales	
	UT	Concentración equivalente		Cd	Hg
		Cd	Hg		
48 h	0.29 (0.24,0.35)	0.36	0.17	7.52	1.76
96 h	0.22 (0.19,0.26)	0.27	0.13	2.49	1.23
168 h	0.19 (0.16,0.22)	0.23	0.11		

### 5.3.2 Cd-Zn

Durante las 168 h de esta prueba se obtuvo el 100% de sobrevivencia con 0.5 y 0.75 UT. Con 1 y 2 UT las mortalidades finales fueron solo del 3.3 y 23.3 %, respectivamente, y el efecto tóxico aumentó en forma progresiva con el incremento de UT, con un 100% de mortalidad entre las 108 y las 48 horas, para 3 y 10 UT, en el orden (Tabla 19).

El número total de mudas en los testigos fue de 25, no muy superior al registrado en los recipientes con 2 UT (23), pero mayor que en todos los demás tratamientos, con la excepción de 10 UT, en el cual se obtuvieron 23 mudas en total, de las cuales las primeras 21 fueron a las 24 horas, con una total correspondencia con el número de organismos muertos registrados en un mismo intervalo.

Evidentemente, en este caso el efecto de la mezcla de estos dos metales es de tipo antagónico, con una  $UT_{50-96 h}$  superior al doble del resultado esperado para un efecto de tipo aditivo ( $UT_{50} > 1 UT$  en vez del esperado  $UT_{50} = 1 UT$ ).

**Tabla 19.** Porcentaje de mortalidad de postlarvas (PL17) expuestas a diferentes unidades tóxicas de Cd-Zn (RT= 1:1). Entre paréntesis se presenta el número de mudas.

Tiempo (h)	Unidad Tóxica									
	Testigo	0.50	0.75	1	2	3	4	6	8	10
12	0 (3)	0	0 (2)	0	0 (2)	3.3 (2)	3.3 (3)	10	20 (5)	40 (16)
24	0 (2)	0	0	0	0	10 (2)	26.6 (4)	30 (3)	56.6 (2)	70 (5)
36	0 (2)	0 (1)	0 (1)	0 (3)	0 (3)	20 (2)	30 (1)	40 (2)	73.3 (1)	80 (2)
48	0	0	0	0	0	43.3	46.6 (1)	46.6 (1)	73.3	100
60	0 (3)	0 (4)	0 (3)	0 (1)	0 (6)	50 (3)	50 (5)	56.6 (2)	90 (2)	
72	0 (1)	0	0	0	0	63.3 (1)	63.3 (1)	70 (2)	100	
84	0	0	0 (3)	0 (3)	0	73.3 (2)	100 (3)	100 (2)		
96	0 (4)	0	0 (1)	0	10 (1)	73.3 (3)				
108	0	0	0	0 (4)	16.6 (1)	100				
120	0 (1)	0 (2)	0 (3)	0 (1)	20 (5)					
132	0 (2)	0 (2)	0	0	23.3 (3)					
144	0 (3)	0	0 (1)	0	23.3					
156	0 (2)	0 (3)	0	3.3 (2)	23.3					
168	0 (2)	0	0 (3)	3.3 (2)	23.3 (2)					
Σ mudas	25	12	17	16	23	15	18	12	10	23

Como se mencionó, los valores de la  $UT_{50}$  superiores a 1, indican que existe un efecto antagónico entre estos dos metales (Tabla 20), puesto que la  $UT_{50-96}$  y 168 h fueron de 2.6 y 2.12, respectivamente, cuya concentración equivalente en la mezcla es ligeramente mayor que su respectiva  $CL_{50-96}$  h obtenida en los experimentos individuales .

**Tabla 20.** Valores de la  $UT_{50}$  y sus límites de confianza ( $\alpha=0.05$ ) (entre paréntesis) de postlarvas de *L. vannamei* (PL17) expuestas a la mezcla de Cd-Zn (RT= 1:1), sus concentraciones equivalentes (nominales) y las de los experimentos individuales (mg/L).

Tiempo de Exposición	$UT_{50}$ de las mezclas			$CL_{50}$ individuales	
	UT	Concentración equivalente		Cd	Zn
48 h	4.63 (4.03,5.29)	5.76	4.81	7.52	8.67
96 h	2.6 (2.4,2.8)	3.23	2.7	2.49	2.08
168 h	2.12 (1.88,2.33)	2.63	2.2		

### 5.3.3 Zn-Hg

En este experimento, los únicos tratamientos donde no se observó el 100% de mortalidad fueron 0.05, 0.10 y 0.15 UT, con el 0, 16.6 y 50%, respectivamente; con 0.25, 0.35, 0.50 y 0.75 UT el 100 % de mortalidad se obtuvo, descendiendo paulatinamente, a 168, 84, 60 y 24 h, en el orden. La misma respuesta se obtuvo con 1, 2 y 4 UT; mientras que con 8 UT el 100 % se obtuvo hasta las 60 h de exposición (Tabla 21).

Con base en el comportamiento observado con la UT más elevada, se pudiera pensar que si esta presente en concentraciones elevadas, el Zn ejerce un efecto protector contra el Hg en las postlarvas de *L. vannamei*, aunque esto debería comprobarse usando diferente RT.

En los recipientes del testigo se observó un total de 21 exuvias, un número igual al registrado para las larvas expuestas a 0.15 UT, y no muy diferente de las 17 y 18 encontradas con 0.05 y 0.25 UT, mientras que con 0.10 UT el total fue de 13 exuvias, y el número disminuyó a entre 8 y 0 para los demás tratamientos, donde el tiempo de exposición fu mucho menor.

La  $UT_{50-96}$  h de esta mezcla fue de 0.17, con concentraciones equivalentes de Zn y Hg muy inferiores, indicando un pronunciado efecto de sinergismo de estos dos metales, que cabe resaltarlo, fueron los de mayor toxicidad de los siete metales que se usaron en los experimentos individuales del presente estudio.

**Tabla 21.** Porcentaje de mortalidad de postlarvas (PL17) expuestas a diferentes unidades tóxicas de Zn-Hg (RT= 1:1). Entre paréntesis se presenta el número de mudas.

Tiempo (h)	Unidad Tóxica											
	Testigo	0.05	0.10	0.15	0.25	0.35	0.50	0.75	1	2	4	8
12	0 (1)	0 (9)	3.3 (8)	10 (4)	13.3 (2)	13.3	30 (2)	60 (2)	43.3	76.6 (4)	60 (6)	40 (4)
24	0 (2)	0	3.3	13.3 (3)	26.6 (4)	33.3 (3)	60	100 (1)	100	100	100	50 (1)
36	0 (2)	0	13.3 (1)	20 (5)	36.6	50 (2)	83.3 (1)					66.6
48	0 (2)	0 (2)	13.3	20 (2)	36.6 (2)	50	90					73.3
60	0	0	13.3	30	40 (1)	63.3 (2)	100 (1)					100
72	0 (3)	0	13.3	40	46.6 (3)	80						
84	0	0 (2)	13.3 (1)	40	60	100 (1)						
96	0 (3)	0	13.3	50 (1)	60 (1)							
108	0 (1)	0	16.6	50 (1)	63.3							
120	0 (2)	0 (1)	16.6	50	63.3							
132	0	0	16.6 (2)	50	76.6 (3)							
144	0 (2)	0 (2)	16.6	50 (2)	76.6							
156	0	0	16.6 (1)	50 (1)	83.3 (1)							
168	0 (3)	0 (1)	16.6	50 (2)	100							
Σ mudas	21	17	13	21	18	8	4	3	0	4	6	5

En la Tabla 22 resalta que 80 y 140 µg/L para Hg y Zn ( $UT_{50} = 0.14$ ), respectivamente, provocaron el 50% de mortalidad de las postlarvas de *L. vannamei* durante 168 h continuas de exposición, valores de 20 y 10 veces menores que aquellos de los experimentos individuales a 96 h.

**Tabla 22.** Valores de la  $UT_{50}$  y sus límites de confianza ( $\alpha=0.05$ ) (entre paréntesis) de postlarvas de *L. vannamei* (PL17) expuestas a la mezcla de Zn-Hg (RT= 1:1), sus concentraciones equivalentes (nominales) y las de los experimentos individuales (mg/L).

Tiempo de exposición	$UT_{50}$ de las mezclas			$CL_{50}$ individuales	
	UT	Concentración equivalente		Zn	Hg
		Zn	Hg		
48 h	0.26 (0.23,0.31)	0.27	0.16	8.67	1.4
96 h	0.17 (0.15,0.19)	0.17	0.10	2.08	1.23
168 h	0.14 (0.12,0.15)	0.14	0.08		

### 5.3.4 Hg-Pb

Las únicas concentraciones de la mezcla de estos dos metales con los cuales no se observó el 100% de mortalidad fueron las de 0.10, 0.15 y 0.25 UT. Este porcentaje se alcanzó a las 108 y 48 h con 0.5 y 0.75 UT, respectivamente, y la sobrevivencia aumentó progresivamente en las dos UT siguientes (1 y 2), en las cuales la mortalidad fue total a las 60 y 72 horas. Después de esta última UT, el tiempo necesario para alcanzar el 0% de sobrevivencia disminuyó nuevamente y en forma progresiva, hasta las 12 horas registradas con 8 UT (Tabla 23).

Globalmente, los dos metales actúan sinérgicamente en el intervalo de 0.15 a 0.75 UT y un efecto similar es igualmente evidente entre 4 y 8 UT, quedando por explicar la aparente remisión de toxicidad para las dosis de 1 y 2 UT que se hace todavía más notoria examinado la tendencia de las mortalidades registradas a las 24 y 36 horas en ese intervalo, que en todos los casos aumentan en el primero de los intervalos mencionados y disminuyen regularmente a partir de 0.75 UT alcanzando un mínimo relativo con la concentración equivalente a 2 UT y vuelven a subir nuevamente hasta el límite superior de las UT probadas.

Esto pudiera ser un efecto antagónico limitado a un intervalo de concentraciones de uno o de ambos metales, como el que se mencionó en el caso de la mezcla entre el Hg y el Zn, que debería ser objeto de una investigación específica, usando otros tipo de mezclas y/o con diferentes RT.

**Tabla 23.** Porcentaje de mortalidad de postlarvas (PL17) expuestas a diferentes unidades tóxicas de Hg-Pb (RT= 1:1). Entre paréntesis se presenta el número de mudas.

Tiempo (h)	Testigo	0.10	0.15	0.25	0.5	0.75	1	2	4	6	8
12	0 (3)	0 (4)	3.3 (4)	3.3 (2)	10 (5)	20 (4)	13.3 (3)	13.3 (2)	33.3 (1)	50	100
24	0 (2)	0 (1)	10 (6)	13.3 (4)	53.3 (4)	63.3	43.3 (3)	20	73.3	100 (2)	
36	0 (2)	0 (1)	16.6 (3)	33.3 (2)	66.6	76.6	66.6	53.3	76.6		
48	0	0 (3)	23.3 (2)	40	73.3	100	83.3	66.6	100		
60	0 (3)	0 (1)	26.6 (3)	50 (1)	76.6		100	76.6			
72	0 (1)	0 (1)	26.6 (4)	50 (1)	80			100			
84	0	0 (3)	30 (3)	50 (1)	80						
96	0 (4)	0 (1)	36.6 (2)	53.3 (1)	83.3 (1)						
108	0	0	36.6	53.3	100						
120	0 (1)	0	36.6	53.3 (2)							
132	0 (2)	0	40 (1)	56.6							
144	0 (3)	0	40 (1)	56.6 (1)							
156	0 (2)	0	40 (1)	56.6 (1)							
168	0 (2)	0	40 (3)	56.6 (1)							
Σ mudas	25	15	33	17	10	4	6	2	1	2	0

Como se mencionó, las  $UT_{50}$  fueron menores que la unidad teórica calculada para el caso del efecto aditivo ( $UT_{50}$  0.28 a 0.20 para 48, 96 y 168 h), indicando un indudable efecto de sinergismo de esta mezcla (Tabla 24).



**Tabla 24.** Valores de la  $UT_{50}$  y sus límites de confianza ( $\alpha=0.05$ ) (entre paréntesis) de postlarvas de *L. vannamei* (PL17) expuestas a la mezcla de Hg-Pb (RT= 1:1), sus concentraciones equivalentes (nominales) y las de los experimentos individuales (mg/L).

Tiempo de exposición	$UT_{50}$ de las mezclas			$CL_{50}$ individuales	
	UT	Concentración equivalente		Hg	Pb
		Hg	Pb		
48 h	0.28 (0.24,0.33)	0.17	18.7	1.4	179.9
96 h	0.23 (0.19,0.27)	0.14	15.4	1.23	134.2
168 h	0.20 (0.17,0.23)	0.12	13.4		

En este experimento resalta el alto número de exuvias observadas en las postlarvas expuestas a 0.15 UT (33 exuvias), un valor mayor del que se registró en los recipientes testigo (25). Por otro lado, este valor es muy diferente de los encontrados en las concentraciones cercanas y no existen antecedentes bibliográficos sobre la mezcla de estos metales, un tópico más que debería ser estudiado con un cuidado particular, en vista de que desviaciones positivas o negativas del ciclo de muda normal pueden ser interpretadas como efectos de la presencia de un estresor.

### 5.3.5. Cu-Zn

Para este experimento, el 100 % de la mortalidad se obtuvo a 4, 6, 8 y 10 UT a 168, 120, 84 y 36 h, en el orden, mientras que el 0, 6.6, 16.6, 30 y 56.6 % de mortalidad, se observó a 0.25, 0.5, 0.75, 1 y 2 UT, respectivamente (Tabla 25).

Como se comentó en el experimento individual de Cu, aparentemente este elemento reduce el tiempo requerido para completar un normal ciclo de muda en crustáceos. En este experimento, en el testigo mudaron 21 organismos, pero en aquellos expuestos a 0.25 y 0.5 UT se observó que un alto número de postlarvas alcanzaron la fase de ecdysis, observándose 39 exuvias en cada uno, indicando una mayor frecuencia de muda a estas concentraciones, fenómeno que no ocurrió en el resto de las UT ensayadas ni en las otras mezclas.

**Tabla 25.** Porcentaje de mortalidad de postlarvas (PL17) expuestas a diferentes unidades tóxicas de Cu-Zn (RT= 1:1). Entre paréntesis se presenta el número de mudas.

Tiempo (h)	Testigo	0.25	0.5	0.75	1	2	4	6	8	10
	12	0 (1)	0 (5)	0 (2)	0 (2)	0	0 (1)	13.3 (2)	13.3 (2)	16.6 (3)
24	0 (2)	0 (3)	0 (5)	0 (4)	0 (5)	0 (5)	13.3 (3)	16.6 (3)	20 (3)	90
36	0 (2)	0	0	0	0	3.3	20	23.3 (2)	23.3	100 (1)
48	0 (2)	0 (3)	0 (5)	0 (1)	0 (1)	13.3 (2)	23.3 (1)	33.3	50 (2)	
60	0	0 (2)	0 (3)	0 (1)	0 (1)	13.3 (2)	30 (1)	46.6	66.6 (1)	
72	0 (3)	0 (4)	0 (1)	0 (1)	0	13.3 (2)	40	63.3 (2)	80	
84	0	0 (3)	0 (3)	0 (4)	6.6 (3)	23.3 (1)	46.6	70	100 (1)	
96	0 (3)	0 (2)	0 (3)	3.3 (3)	10 (6)	33.3 (3)	46.6	83.3 (1)		
108	0 (1)	0 (3)	3.3 (5)	3.3 (1)	13.3 (1)	36.6 (4)	50 (3)	83.3		
120	0 (2)	0 (3)	3.3 (1)	3.3 (2)	20	46.6	60 (1)	100 (1)		
132	0	0 (2)	3.3 (5)	3.3 (1)	23.3 (1)	50 (1)	63.3			
144	0 (2)	0 (3)	3.3 (4)	10 (3)	30 (3)	50 (1)	70			
156	0	0 (4)	3.3 (2)	10 (1)	30 (2)	56.6 (1)	83.3			
168	0 (3)	0 (2)	6.6	16.6 (3)	30 (2)	56.6	100			
Σ mudas	21	39	39	27	25	23	11	11	10	1

Contrariamente al efecto observado para la mezcla de Zn-Hg, el resultado de la interacción de estos dos elementos, que son esenciales para los crustáceos decápodos, fue de antagonismo, como lo demuestran los altos valores de las  $UT_{50}$  presentadas en la tabla 26, que confirma plenamente la actividad antagónica de estos metales.

**Tabla 26.** Valores de la  $UT_{50}$  y sus límites de confianza ( $\alpha=0.05$ ) (entre paréntesis) de postlarvas de *L. vannamei* (PL17) expuestas a la mezcla de Cu-Zn (RT= 1:1), sus concentraciones equivalentes (nominales) y las de los experimentos individuales (mg/L).

Tiempo de exposición	$UT_{50}$ de las mezclas			$CL_{50}$ individuales	
	UT	Concentración equivalente		Cu	Zn
		Cu	Zn		
48 h	6.09 (5.21,7.22)	140	6.33	56.8	8.67
96 h	2.98 (2.51,3.54)	68.5	3.09	37.3	2.08
168 h	1.44 (1.23,1.73)	33.1	1.49		

### 5.3.6. Fe-Mn

En esta prueba se observó un porcentaje mínimo de mortalidad con 1 UT (3.3 %) durante las 168 h de duración de la prueba de toxicidad, y esta mortalidad a las 168 h aumentó con 1.5 y 2 UT a 53.3 y 100 %, en el orden. Posteriormente, el 100 % de mortalidad se fue observando a menores tiempos de exposición conforme aumentó la UT, obteniendo el 100 % a las 12 h en 4 y 8 UT (Tabla 27).

Sobresale la baja mortalidad observada en las postlarvas durante las primeras 48 horas cuando son expuestas a las concentraciones equivalentes a 0.75, 1, 1.5 y 2 UT.

En este experimento no se observó una relación de la interacción Fe-Mn con el ciclo de muda, puesto que en el testigo se observaron 20 exuvias, lo cual contrasta con las exuvias registradas a 0.75 y 1 UT, con las cuales donde 2 y 25 organismos alcanzaron la fase de ecdysis, respectivamente.

A diferencia de otros experimentos, se observa que las postlarvas de *L. vannamei* expuestas a la mezcla de Fe-Mn, no tuvieron una alta incidencia de mudas durante las primeras doce horas de exposición, siendo un valor máximo de 3 exuvias observadas a 1.5 UT, y de 0 exuvias a las más altas UT.

**Tabla 27.** Porcentaje de mortalidad de postlarvas (PL17) expuestas a diferentes unidades tóxicas de Fe-Mn (RT= 1:1). Entre paréntesis se presenta el número de mudas.

Tiempo (h)	Testigo	0.75	1	1.5	2	2.5	3	3.5	4	8
12	0 (2)	0	0 (2)	0 (3)	0 (4)	20 (2)	46.6 (1)	73.3 (1)	100	100
24	0 (1)	0	0	0 (2)	0 (1)	20 (1)	60 (2)	100		
36	0 (3)	0	0 (1)	0	0	46.6 (1)	80			
48	0	0	0 (8)	0 (2)	0 (3)	53.3 (1)	90 (1)			
60	0 (2)	0	0 (3)	0 (2)	6.6	60	100			
72	0 (1)	0	0 (2)	6.6 (1)	20 (2)	60				
84	0 (2)	0	0	16.6	53.3	66.6 (2)				
96	0	0 (1)	0 (3)	23.3	56.6 (2)	80				
108	0 (3)	0 (1)	0	33.3 (2)	56.6	86.6				
120	0	0	0 (2)	33.3	56.6 (2)	100				
132	0 (1)	0	0 (1)	43.3 (2)	56.6					
144	0 (3)	0	0	50	56.6 (1)					
156	0	0	0	50	96.6					
168	0 (2)	0	3.3 (5)	53.3 (1)	100					
Σ mudas	20	2	25	13	13	7	4	1	0	0

Como en el caso de Cu-Zn, pero en menor grado, la interacción de estos dos elementos esenciales resultó ser antagónica, ya que a 0.75 y 1 UT no se observó mortalidad alguna a 96 h y ésta alcanzó solamente el 3.3 % a las 168 h con 1 UT. Con 2 y 2.5 UT el 100 % se registró a tiempos de exposición mayores a 96 h y además la  $UT_{50}$  fue siempre mayor que 1 (Tabla 28).

**Tabla 28.** Valores de la  $UT_{50}$  y sus límites de confianza ( $\alpha=0.05$ ) (entre paréntesis) de postlarvas de *L. vannamei* (PL17) expuestas a la mezcla de Fe-Mn (RT= 1:1), sus concentraciones equivalentes (nominales) y las de los experimentos individuales (mg/L).

Tiempo de Exposición	$UT_{50}$ de las mezclas			$CL_{50}$ individuales	
	Concentración equivalente			Fe	Mn
	UT	Fe	Mn		
48 h	2.52 (2.41,2.63)	55.4	163	52.5	178
96 h	1.88 (1.74,2.02)	41.6	122	44.2	130
168 h	1.43 (1.33,1.53)	31.4	93		

Es importante comentar, que en ninguna de los seis experimentos de las mezclas fue necesario llevar a cabo la prueba de independencia propuesto por Sokal y Rohlf (1979), puesto que el tipo de interacción observada fue muy marcada en cada caso.

#### 5.4 Experimento con diferentes factores de aplicación.

Con base en los resultados de la segunda parte de este trabajo, y dado de que en el medio natural y en los laboratorios de producción de larvas, los organismos siempre están expuestos a una mezcla de todos los elementos, se decidió realizar otro experimento utilizando la mezcla de los siete metales con la concentración obtenida multiplicando la  $CL_{50-96}$  h por los factores de aplicación de 0.01, 0.025, 0.05 y 0.1, oscilando las concentraciones para Cd, Cu, Fe, Hg, Mn, Pb y Zn en 0.025-0.25, 0.373-3.73, 0.442-4.42, 0.012-0.124, 1.3-13, 1.34-13.4 y 0.021-0.21 mg/L, respectivamente; es decir, que las concentraciones individuales de cada metal oscilaron desde una décima hasta una centésima parte de la respectiva  $CL_{50-96}$  h.

De acuerdo con Ahsanullah *et al.* (1981), para proporcionar un valor seguro, las pruebas de toxicidad debieran continuarse hasta cuando se tenga una seguridad razonable de que no exista variación significativa en las respuestas de los organismos expuestos, porque los valores letales no son los mismos en pruebas de diferente duración, como recalcaron también Bryant *et al.* (1985) y como de hecho se pudo notar prácticamente en todas las pruebas llevadas a cabo con metales aislados o en mezcla; por tal motivo se decidió exponer a los organismos por un periodo de 21 días.

En la tabla 29 se presentan los resultados de este último experimento. Con el factor de aplicación de 0.1, se obtuvo un 16.6 % de mortalidad desde la primeras 24 h de exposición. A los cuatro días se acercó al 50 % y fue aumentando paulatinamente hasta el 100 % a los 13 días de exposición. Con respecto al FA de 0.05, a las 24 h se observó el 6.6 % de mortalidad, el 63.3 % se presentó a los 18 días de exposición continua; y el número de sobrevivientes se mantuvo constante hasta el final de la prueba (21 días).

Por otra parte, los organismos expuestos a las más bajas concentraciones (factor de aplicación de 0.01 y 0.025) no experimentaron mortalidad durante los 21 días de exposición continua; sin embargo, una diferencia de sus respuestas a tales combinaciones fue la del crecimiento, puesto que a 0.01 se observaron 88 exuvias, es decir que en promedio, cada organismo mudó 2.93 veces, en comparación con las 3.27 de los organismos testigo, mientras que a 0.025 la proporción de muda fue de 1.53.

Aparentemente, en los organismos expuestos a las concentraciones equivalentes a 0.025 FA la mezcla produce un efecto subletal, que tiene como resultado una disminución del crecimiento; esto no se apreció en los organismos en los recipientes de 0.01 FA, en los cuales la proporción de muda fue muy similar a la registrada en los testigos.

Mediante este experimento se confirmó que el factor de aplicación propuesto por Sprague (1971) de 0.1, no es siempre el adecuado cuando se utilizan mezclas de metales, ya que evidentemente los efectos del sinergismo entre metales son más importantes que los antagonicos que se describieron para dos de las seis pruebas anteriores.

El efecto negativo de esta combinación se refleja también en los pesos finales de los organismos que sobrevivieron en 0.01, 0.025 y 0.05 FA, cuyo peso húmedo promedio fue de  $13.11 \pm 8.19$ ,  $8.25 \pm 4.88$  y  $4.01 \pm 1.7$  mg, respectivamente, demostrando que a medida que se incrementó el FA, el crecimiento de los organismos expuestos se redujo. Al comparar estos pesos con los recabados en los testigos ( $18.2 \pm 11.3$  mg) (comparación de medias, Miller y Miller, 1987), el análisis estadístico reveló que la única diferencia que no

resultó significativa fue entre los organismos expuestos a 0.01 FA y los testigos, mientras que en los demás casos, todas las diferencias resultaron significativas ( $p < 0.05$ ).

**Tabla 29.** Porcentaje de mortalidad de postlarvas (PL17) expuestas a mezclas (concentraciones nominales) de Cd, Cu, Fe, Hg, Mn, Pb y Zn con diferente factor de aplicación; mudas entre paréntesis.

Día	Factor de aplicación				
	testigo	0.01	0.025	0.05	0.1
1	0 (5)	0 (3)	0 (2)	6.6 (4)	16.6 (5)
2	0 (5)	0 (3)	0 (1)	10 (2)	36.6 (1)
3	0 (5)	0 (4)	0 (1)	13.3 (3)	40
4	0 (7)	0 (6)	0 (3)	13.3 (2)	46.6
5	0 (4)	0 (8)	0 (3)	16.6 (4)	60 (3)
6	0 (11)	0 (6)	0 (5)	16.6 (3)	76.6 (4)
7	0 (12)	0 (5)	0 (5)	20 (1)	76.6
8	0 (4)	0 (3)	0 (1)	20 (4)	80 (2)
9	0 (9)	0 (4)	0	23.3 (2)	83.3
10	0 (7)	0 (7)	0 (3)	30 (5)	83.3 (1)
11	0 (1)	0 (3)	0 (3)	33.3 (3)	86.6
12	0 (2)	0 (2)	0	40 (2)	90
13	0 (6)	0 (2)	0 (1)	40 (1)	100 (1)
14	0 (1)	0 (9)	0 (4)	40 (3)	
15	0 (1)	0 (3)	0 (6)	43.3 (2)	
16	0 (6)	0 (3)	0	50 (2)	
17	0 (4)	0 (2)	0	60 (3)	
18	0 (2)	0 (5)	0 (3)	63.3 (1)	
19	0 (3)	0 (1)	0 (3)	63.3 (2)	
20	0 (1)	0 (7)	0 (3)	63.3 (1)	
21	0 (2)	0 (2)	0	63.3 (2)	
$\Sigma$ mudas	98	88	47	52	17

## 5.5 Consumo de alimento

En el presente trabajo los intervalos de las concentraciones que se probaron fueron suficientemente amplios para poder observar el comportamiento alimenticio de las postlarvas de *L. vannamei* expuestas a dosis inferiores a las  $CL_{50}$  y  $UT_{50}$  que se calcularon en este estudio.

Los resultados de estas observaciones se resumen en las siguientes tablas, considerando solamente los casos de exposición a dosis inferiores a las que se calcularon como letales a 96 y 168 h, además de los que se tuvieron en la única prueba en la que se utilizaron los siete metales en combinación.

### 5.5.1 Pruebas de toxicidad individuales

Los valores medios de consumo de alimento que se calcularon para las concentraciones de cada metal inferiores a la  $CL_{50-96}$  h muestran efectos diferentes para los diversos metales. Aún considerando el factor de aplicación de 0.1 para el cálculo de las dosis permisibles de cada metal aisladamente (Sprague, 1971), las larvas expuestas a 1 mg/L de Cd, cuatro veces más alta de este nivel, consumieron en promedio cerca del 75 % del alimento ingerido por los testigos.

En los organismos expuestos al Cu, la disminución del consumo de alimento fue muy notoria aún en los grupos donde no se obtuvo ninguna mortalidad, puesto que a 12 mg/L de Cu total el consumo fue de 33.3 %, mientras que a 36 mg/L fue del 29.2 %.

En presencia de Fe, aparentemente existe una relación entre la dosis de metal aplicadas y el consumo de nauplios de *Artemia*; éste disminuyó desde un 71 a un 45.8 % con respecto a los testigos cuando la concentración se acercó a la  $CL_{50}$ . Es decir, una cantidad de Fe cercana al 70 % de la  $CL_{50-96}$  h, aunque no causó mortalidad, disminuyó en un 30 % la cantidad de nauplios consumidos.

Por el contrario, una concentración de Mn que causó mas del 25 % de mortalidad en 96 h, no disminuyó la actividad de alimentación de las postlarvas y lo mismo sucedió con el Pb,



con el cual el consumo de nauplios varió entre un 70.8 y un 95.8 % de los testigos y cabe mencionar que con la dosis que más se acercó a la  $CL_{50}$ , las postlarvas consumieron poco más del 90 % de las mantenidas en agua libre de metales.

El Hg, como el Cu, causó una notable disminución en el actividad de la alimentación, lo cual es evidenciada por las postlarvas expuestas a 0.5 y 1 mg/L, donde el consumo promedio de alimento fue del  $58.3 \pm 14.4\%$  en ambas concentraciones.

Por su parte, las postlarvas expuestas al Zn mostraron un comportamiento similar al que tuvieron con Fe, ya que se observó una notable disminución del consumo de alimento al ser expuestas entre 1 y 1.5 mg/L de este metal (Tabla 30). Así mismo, también se puede observar que una concentración cercana al 50 % de la  $CL_{50-96 h}$ , no causó una disminución evidente de la actividad alimenticia de las postlarvas de *L. vannamei*.

**Tabla 30.** Consumo de alimento de las postlarvas de *L. vannamei* expuestas a los metales de manera individual a concentraciones inferiores (mg/L) a la  $CL_{50-96 h}$ . Valores máximos y mínimos de consumo (en paréntesis horas de exposición).

Metal	$CL_{50}$ (mg/L)	Conc.	% mortalidad	% Consumo alimento	Máximo (h)	Mínimo (h)
Cd	2.49	1.0	20	$75 \pm 18.6$	100 (12)	50 (84)
Cu	37.3	12	0	$33.3 \pm 35.3$	83.3 (84)	0 (12,36)
		16	20	$16.7 \pm 20.4$	50 (84)	0 (36,60)
		32	43.3	$29.2 \pm 21.7$	50 (60,80)	0 (12)
Fe	44.3	30	0	$70.8 \pm 21.6$	100 (12)	50 (60,84)
		40	23.3	$45.8 \pm 29.7$	83.3 (12)	0 (36)
Mn	130	50	0	$91.7 \pm 8.4$	100 (12,36)	83.3 (60,84)
		100	26.6	$91.7 \pm 8.4$	100 (12,36)	83.3 (60,84)
Hg	1.23	0.5	0	$58.3 \pm 14.4$	83.3 (60)	50 (12,36,84)
		1.0	6.6	$58.3 \pm 14.4$	83.3 (60)	50 (12,36,84)
Pb	134	60	10	$95.8 \pm 7.2$	100 (12,36,84)	83.3 (60)
		80	23.3	$91.7 \pm 8.4$	100 (12,36)	83.3 (60,84)
		100	33.3	$70.8 \pm 24.7$	100 (84)	33.3 (60)
		125	36.6	$87.5 \pm 13.8$	100 (12,36)	66.6 (60)
Zn	2.08	1.0	0	$91.7 \pm 8.4$	100 (36,84)	83.3 (12,60)
		1.5	33.3	$58.3 \pm 27.6$	83.3 (12,36)	16.6 (84)

En resumen, el metal que más afectó la actividad de alimentación de las postlarvas de *L. vannamei* fue el Cu, lo cual pudiera estar relacionado con el alto número de mudas, ya que en la fase de ecdysis los crustáceos disminuyen o cesan completamente su actividad de

alimentación, efecto que debería ser tomado en consideración en los laboratorios de producción comercial de postlarvas, puesto que en algunos de ellos se adicionan sales de Cu para acelerar el crecimiento larvario y postlarvario. Como en el caso del Hg, la disminución del consumo de alimento no se relaciona con la concentración de Cu en el medio, por lo menos en el intervalo de las dosis probadas y lo mismo parece ocurrir con el Pb, donde la disminución es poco evidente o por lo menos el consumo de alimento es altamente variable.

### 5.5.2 Pruebas de toxicidad con mezclas (RT= 1:1)

Como en el caso de las pruebas de exposición a diferentes concentraciones de metales individuales, se obtuvieron resultados contrastantes, que globalmente parece indicar que la observación del consumo de alimento no es un indicador confiable de la presencia de un factor de estrés para las postlarvas de *L. vannamei* (Tabla 31).

**Tabla 31.** Consumo de alimento en postlarvas de *L. vannamei* expuestas a las mezclas de metales (1:1) a concentraciones inferiores (mg/L) a la  $UT_{50}$ -168 h. Valores máximos y mínimos (entre paréntesis horas de exposición).

Mezcla	$UT_{50}$	UT	% mortalidad	% Consumo alimento	Máximo (h)	Mínimo (h)
Cd-Hg	0.19	0.05	3.3	97.6±5.8	100 (36-156)	83.3 (12)
		0.10	16.6	95.2±7.5	100 (12,36,84,132,156)	83.3 (60,108)
		0.15	36.6	92.8±8.3	100 (36,84,132,156)	83.3 (12,60,108)
Cd-Zn	2.12	0.50	0	100±0	100	--
		0.75	0	97.6±5.8	100 (12-60,108-156)	83.3 (84)
		1	3.3	92.8±8.3	100 (60,108-156)	83.3 (12,36,84)
		2	23.3	64.3±13.9	83.3 (60,156)	50 (36,108,132)
Zn-Hg	0.14	0.05	0	100±0	100	--
		0.1	16.6	95.2±7.5	100 (60,156)	83.3 (12-36)
Hg-Pb	0.20	0.1	0	92.8±8.3	100 (60,108-156)	83.3 (12,36,84)
		0.15	40	78.5±11.7	100 (12)	66.6 (36-84)
Cu-Zn	1.44	0.25	0	100±0	100	--
		0.5	6.6	85.7±12.7	100 (12,84)	66.6 (132)
		0.75	16.6	78.5±11.7	83.3 (12-108,156)	50 (132)
		1	30	73.8±15	83.3(12-108)	50(132-156)
Fe-Mn	1.43	0.75	0	100±0	100	--
		1	3.3	95.2±7.5	100 (12-108)	83.3 (132-156)

De las tres mezclas que incluyeron el más tóxico de los metales que se usaron en este trabajo (Hg), solamente en el caso de Hg-Pb se notó una disminución evidente de la alimentación cuando la UT utilizada se acercó a la  $UT_{50}$ -168 h, lo cual además causó un 40 % de mortalidad. En cambio, la mezcla Cd-Hg, con la UT de 0.15, tuvo una mortalidad similar a la de Hg-Pb, en la cual no se observó una disminución significativa del número nauplios consumidos, y lo mismo se observó en el caso de Zn-Hg.

En Las pruebas con la mezcla Cd-Zn, se observó un efecto sobre la alimentación solamente cuando la UT utilizada superó el 90 % de la  $UT_{50}$ -168 h, con la cual se obtuvo un 23 % de mortalidad y un 35 % de disminución de la cantidad de nauplios ingeridos. En el caso de Cu-Zn la disminución se hizo notoria cuando la UT utilizada fue cercana o superior al 50 % de la  $UT_{50}$ . Finalmente, no se notó ningún efecto para la mezcla Fe-Mn, hasta una UT equivalente al 70 % de la  $UT_{50}$  calculada para estas pruebas.

### 5.5.3 Pruebas con diferente factor de aplicación

La prueba de la mezcla de los siete metales que se llevó a cabo con diferentes factores de aplicación para determinar el nivel de toxicidad, no reveló diferencias estadísticamente significativas en el consumo de alimento cuando se usaron los factores de 0.01 y 0.025, y solamente con el factor de 0.05, con el cual se obtuvo más del 60 % de mortalidad después de 21 días de exposición, el consumo de alimento resultó altamente variable, pero solo ligeramente inferior al 85 % del valor obtenido en los testigos (Tabla 32).

**Tabla 32.** Consumo de alimento en postlarvas de *L. vannamei* expuestas a las mezclas de metales (1:1) a concentraciones inferiores (mg/L) a la  $UT_{50}$ . Valores máximos y mínimos en porcentaje.

FA	% de Mortalidad	% Consumo de alimento	Máximo	Mínimo
0.01	0	100±0	100	0
0.025	0	97.6±5.8	100	83
0.05	63	84.1±17.4	100	50

## 6. DISCUSIONES

### 6.1 Pruebas de toxicidad individuales

Las pruebas de toxicidad aguda han sido utilizadas principalmente para establecer criterios de calidad de agua y proteger de esta forma el ambiente acuático (Ahsanullah y Arnott, 1978), aunque algunos de estos estudios con invertebrados y peces marinos y dulceacuícolas se han llevado a cabo con el fin de comparar la sensibilidad de diferentes especies y el potencial tóxico de los metales, además que para obtener las concentraciones ambientales seguras utilizando los valores de la CL<sub>50</sub>-96 h de los metales y los factores de aplicación preestablecidos (Ahsanullah *et al.*, 1981).

A manera de consideración general para cada una de las discusiones del presente estudio, es importante comentar que un factor muy importante a considerar en las pruebas de toxicidad es la edad de los organismos (Buikema *et al.*, 1982). Nimmo *et al.* (1977) demostraron que las larvas de crustáceos son de 3 a 10 veces más sensibles que los adultos; además Greenwood y Fielder (1983) concluyeron que, como en el caso de algunos otros contaminantes ambientales, la tolerancia a los metales pesados por parte de los estadios larvarios es menor que en los adultos y esto se debe a que las larvas no tienen todavía bien desarrollados sus mecanismos de defensa (Shane, 1994). Este tipo de observaciones se consideró en el presente estudio, al comparar los resultados obtenidos con otros existentes en la literatura.

Además, en las pruebas de toxicidad en las cuales se utilizan como tóxico a algún metal, es importante considerar la salinidad del medio, ya que por un lado ésta altera la especiación química del elemento en cuestión; y por el otro, modifica los mecanismos de osmoregulación de los decápodos, puesto que en los sistemas estuarinos existe un gradiente de la salinidad tanto espacial como temporal, y estos cambios pueden provocar ajustes en la concentración interna de los iones mayoritarios (osmolaridad) mediante la incorporación de agua. Este incremento en la captura de agua puede inducir una difusión hacia el interior del organismo, provocando con esto una mayor acumulación de metales y por ende una mayor toxicidad (Bianchini y Gilles, 1996).

En este contexto, se podría esperar una relación entre la salinidad del ambiente (hábitat) y la toxicidad del elemento en cuestión para diferentes especies eurihalinas dependiendo de sus capacidades osmoreguladoras. Aunque en el presente estudio la salinidad se mantuvo aproximadamente constante, este tipo de consideraciones pudiera resultar muy importante al intentar de aplicar los resultados de este tipo de estudios a situaciones de cultivo diversas, es decir, con diferentes salinidades.

### 6.1.1 Cd

De acuerdo con la EPA (1991), el cadmio es uno de los cinco metales considerados de mayor toxicidad para la fauna de los sistemas acuáticos y terrestres; sus principales fuentes antropogénicas son los efluentes industriales y municipales, en tanto que los aportes naturales son el intemperismo, la escurrentía y el transporte atmosférico.

De Conto Cinier *et al.* (1998) señalan que el cadmio constituye un problema de gran magnitud ecológica, debido a que la presencia de determinados ligandos permite que este elemento se pueda acumular por absorción a través de las branquias hasta alcanzar niveles superiores a los del medio ambiente.

Debido a que no se determinaron las diferentes especies químicas del Cd en las soluciones de prueba, los valores de las  $CL_{50}$  en el presente estudio están referidas como Cd total. De acuerdo con Hall *et al.* (1995), la especiación inorgánica del Cd en aguas naturales está en función del pH, de la temperatura, de la fuerza iónica de la solución y de las concentraciones de potenciales ligandos. En agua marina, Byrne *et al.* (1988) estimaron que el 97.2% de Cd inorgánico disuelto existe como compuestos del cloro, predominantemente CdCl y CdCl<sub>2</sub>, mientras que el ión metálico libre representa menos del 3%; incluso en ambientes estuarinos, los cloruros dominan la especiación de este metal (Hall *et al.*, 1995).

En comparación con los resultados de este estudio, Jennings y Rainbow (1979) observaron un porcentaje de mortalidad del 50 % en organismos adultos del cangrejo *Carcinus maenas* expuesto a 10 mg/L de Cd, mientras que Canli y Furness (1993) registraron en 96 horas un

15 % de mortalidad en *Nephrops norvegicus* expuesto a 0.1 mg/L de Cd. Aparentemente, las postlarvas de *L. vannamei* poseen una tolerancia al Cd que es intermedia entre la de *C. maenas*, organismo típico de aguas costeras, de lagunas y de estuarios, y de *N. norvegicus*, que vive en aguas relativamente profundas y en mar abierto, aunque una comparación entre organismos debería hacerse considerando también su etapa de desarrollo.

La causa de la mortalidad de las postlarvas en el presente estudio, pueden ser explicadas con base en los siguientes trabajos. De acuerdo con Landis y Yu (1999), el Cd es tóxico en pequeñas cantidades y no existe evidencia de que este elemento desempeñe alguna función biológica. Estos autores han demostrado que el principal efecto tóxico del Cd es que se une a los grupos SH (ligandos) de la membrana y de otros constituyentes celulares, causando alteraciones estructurales y funcionales. Además, induce un daño a la mitocondria, con lo cual desacopla la fosforilación oxidativa, causando un deterioro del metabolismo energético de la célula.

Dhavale y Masurekar (1988) expusieron al cangrejo *Scylla serrata* a concentraciones letales de Cd y observaron que se redujo significativamente la actividad de la Na, K-ATPasa en las branquias. Postel *et al.* (1998) al someter a *Carcinus maenas* a Cd, observaron que este metal se unía a la misma enzima con un alto grado de irreversibilidad, provocando una alteración en el estado de fosforilación de dicha molécula.

Verbost *et al.* (1989) concluyeron que aparentemente el Cd entra a la célula a través de los canales de Ca en la membrana apical y Rainbow (1997), expresó que hay canales específicos para cada uno de los iones esenciales, pero que los no esenciales entran a la célula por esos mismos canales o por los designados a los iones mayoritarios como el Ca, lo cual llega a inhibir la bomba de Ca en la membrana basolateral, provocando un aumento de Ca al interior de la célula. De acuerdo con Hansen *et al.* (1992) iones libres de Ca en concentraciones anormalmente altas activan fosfolipasas, provocando una hidrólisis autocatalítica de fosfolípidos y por ende, la muerte celular.

Así mismo, Krishnaja *et al.* (1987) describieron cambios histopatológicos en las branquias de *Scylla serrata* expuesto a 2.4 mg/L por 30 días, como una proliferación celular (hiperplasia) con algunas regiones necróticas; lo cual es importante debido al papel que desempeñan las branquias en la respiración y la osmoregulación.

Evidentemente, estos efectos pudieron ocurrir en las postlarvas de *Litopenaeus vannamei*, por lo que un estudio sobre los efectos subletales de este elemento en esta especie, sería de gran ayuda para corroborar la toxicodinámica del Cd en esta especie.

Con respecto al ciclo de muda, los peneidos incrementan su talla en una serie de pasos: un rápido aumento en la ecdysis es seguido por un periodo sin crecimiento o bien con un pequeño incremento hasta la siguiente ecdysis. En esta fase, la cual está caracterizada por el desprendimiento del exoesqueleto, el organismo absorbe una gran cantidad de agua de su entorno para incrementar el volumen de su cuerpo, ya que la cantidad de agua absorbida determina el tamaño del cuerpo hasta la muda siguiente (Dall *et al.*, 1990).

En este aspecto, y como se comentó en la sección anterior, no se observó una relación entre el número de exuvias y la mortalidad, con la excepción de los organismos expuestos a 2.5 mg/L, en la cual, de las 17 postlarvas que murieron, 15 se encontraban en el estadio de ecdysis. Según White y Rainbow (1986), los decápodos no pueden regular la concentración interna de los metales no esenciales como el Cd y el Hg, de tal manera que estos elementos pueden acumularse en los tejidos en altas concentraciones; y de acuerdo con Kito *et al.* (1986) a esa alta concentración la cantidad acumulada de Cd excede la habilidad del animal para sintetizar metalotioneínas, el cual se une a proteínas de alto peso molecular (estructuras no-tioneínas), y esta acumulación en otras partes del cuerpo tiene efectos tóxicos que se manifiestan con anomalías estructurales y de desarrollo, entre otros efectos que ya se comentaron.

De hecho, Weis (1978) observó que los cangrejos retardaban significativamente su ciclo de muda al ser expuestos al Cd, concluyendo que este elemento inhibe algunas enzimas encargadas del proceso fisiológico de la muda. Bjerregaard (1988) observó que *Carcinus*

*maenas* era más sensible al Cd en el estadio de ecdysis que en la intermuda, y Zanders y Rojas (1992) determinaron una concentración de Cd más alta en los anfípodos (*Elasmopus rapax*) muertos que en los vivos y además observaron que la mayoría de los organismos muertos se encontraban en la fase de ecdysis.

En lo que concierne a la  $CL_{50}$ , los datos presentados en la literatura y recopilados por Sullivan (1977) para varias especies de cangrejos marinos oscilan entre 15.7 y 101.9 mg/L, mientras que Phillips (1980), mediante pruebas llevadas a cabo en crustáceos adultos, encontró valores de 0.3-61.5 mg/L. Posteriormente, la EPA (1985) presentó un intervalo más amplio para especies de invertebrados marinos de 0.04 a 135 mg/L de Cd total. Los resultados del presente estudio se encuentran en este intervalo, aunque son inferiores a los de Sullivan (1977), probablemente porque este autor se refiere a organismos adultos, los cuales tienen una mayor resistencia al Cd (Buikema *et al.*, 1982).

En comparación con otros crustáceos, aparentemente *L. vannamei* se encuentra como una especie tolerante al Cd, incluso presentó una mayor tolerancia que algunos juveniles y adultos las cuales presentan una mayor tolerancia a este metal que sus formas larvarias (Tabla 33), con excepción de los estados larvarios de *Rhithropanopeus harrisi* y *Palaemonetes pugio*, cuya tolerancia al Cd es alta.

Sin embargo, como se comentó anteriormente, sería importante verificar la salinidad a la cual se llevaron a cabo todas estas pruebas de toxicidad, puesto que conforme disminuye la salinidad se incrementa la concentración del ión libre del Cd, y con ello su toxicidad (Hall *et al.*, 1995).

Aunado a lo anterior, la toxicidad y la biodisponibilidad de los metales traza a organismos acuáticos ha sido relacionada con la actividad del ión libre cuyas concentraciones pueden ser mucho más bajas que las totales debido a la captura por ligandos orgánicos e inorgánicos de la solución (Sunda *et al.*, 1987). Como se comentó anteriormente, en el caso del cadmio los cloruros son dominantes en aguas marinas, por lo cual es importante considerar el valor de la salinidad cuando se lleven a cabo pruebas de toxicidad de este tipo



y referir los resultados en términos de toxicidad del Cd total (Gentile, 1982; Sullivan *et al.*, 1983).

**Tabla 33.** Comparación de CL<sub>50</sub> de Cd en varias especies de crustáceos.

Especie	CL <sub>50</sub> (mg/L)				Referencia
	24-h	48-h	72-h	96-h	
<i>Cancer magister</i> (zoea)				0.247	Martin <i>et al.</i> (1981)
<i>Scylla serrata</i> (zoea)		0.078			Ramachandran <i>et al.</i> (1997)
<i>Rhithropanopeus harrisi</i> (larva)				3.37	Thorpe y Costlow (1989)
<i>Palaemonetes pugio</i> (larva)				1.88	Thorpe y Costlow (1989)
<i>Marsupenaeus japonicus</i> (larva)				0.030	Bambang <i>et al.</i> (1994)
<i>Palaemon serratus</i> (larva)			1.68		Mariño-Balsa <i>et al.</i> (2000)
<i>Maja squinado</i> (larva)			0.158		Mariño-Balsa <i>et al.</i> (2000)
<i>Litopenaeus vannamei</i> (postlarva)	11.46	7.52	4.08	2.49	Este estudio
<i>Farfantepenaeus duorarum</i> (juvenil)				5	Nimmo <i>et al.</i> (1977)
<i>Callinectes similis</i> (juvenil)				6.35	Ramírez <i>et al.</i> (1989)
<i>Uca annulipes</i> (juvenil)		24.22		15.91	Uma-Devi (1987)
<i>Uca triangularis</i> (juvenil)		15.19		7.66	Uma-Devi (1987)
<i>Palaemonetes pugio</i> (juvenil)		1.3			Burton y Fisher (1990)
<i>Procambarus clarkii</i> (juvenil)				1.04	Naqvi y Howell (1993)
<i>Litopenaeus setiferus</i> (juvenil)				0.99	Vanegas <i>et al.</i> (1997)
<i>Palaemon elegans</i> (juvenil)	9.54	3.54		0.67	Lorenzon <i>et al.</i> (2000)
<i>Callinassa australiensis</i> (adulto)				6.33	Ahsanullah <i>et al.</i> (1981)
<i>Scylla serrata</i> (adulto)	119	38	24	18	Krishnaja <i>et al.</i> (1987)
<i>Callinectes similis</i> (adulto)				6.35	Ramírez <i>et al.</i> (1989)

Hall *et al.* (1995) al someter al copépodo *Eurytemora affinis* y al pez *Cyprinidon variegatus* a diferentes salinidades (5, 15 y 25 ‰) pero a la misma concentración de CdCl<sub>2</sub>, encontraron que la CL<sub>50</sub> disminuía al disminuir la salinidad; por este motivo, concluyeron

que a baja salinidad el ión libre es el principal responsable de la toxicidad, pero que los cloruros ( $\text{CdCl}$ ,  $\text{CdCl}_2$ ) son también tóxicos para los organismos acuáticos.

Es interesante notar que la  $\text{CL}_{50}$  para varios organismos adultos como *Callinassa australiensis* es cercana al 10 % o es inferior a la que se encontró para las postlarvas de *L. vannamei* que, según Kraus *et al.* (1988) pudiera relacionarse con patrones genéticos adquiridos en dependencia del hábitat típico de cada especie en particular, lo que les permitiría desarrollar mecanismos de defensa para los xenobióticos.

Esta capacidad para tolerar al Cd puede referirse a la capacidad de inducción de las metalotioneínas (MT), las cuales son una familia de proteínas de bajo peso molecular (6,000-10,000 Da), con un contenido de S (uno de los tres ligandos predominantes entre las biomoléculas: S, N, y O) superior al 30 % y una constante de afinidad ( $K_a$ ) elevada para los iones metálicos (Carpene, 1993).

De acuerdo con Aoki *et al.* (1989) las larvas de especies sensibles al Cd carecen de la capacidad de inducción de MT, y estas especies no se encuentran en ambientes contaminados por metales, lo cual sería interesante investigar este tópico en *L. vannamei*.

### 6.1.2 Cu

De acuerdo con Harris (1991), el Cu es un elemento esencial para la vida de los organismos, ya que forma parte de la estructura de más de 30 enzimas y otras moléculas. Todos los artrópodos, incluyendo a los crustáceos, tienen hemocianina como pigmento respiratorio (Barnes, 1989), por lo cual necesitan cantidades relativamente importantes de cobre, que es el componente activo del grupo prostético de este pigmento (Truchot y Rtal, 1998), aunque, como en el caso de los otros metales esenciales, una concentración excesiva puede tener efectos adversos para los crustáceos marinos (Chinni *et al.*, 2000).

Existe en la literatura alguna información sobre los porcentajes de mortalidad obtenidos con postlarvas de decápodos: Hubschman (1967) observó una mortalidad del 100 % en postlarvas de *Orconectes rusticus* después de 12 h de exposición a 1 mg/L de Cu. La

mortalidad de los juveniles de *Nephrops norvegicus* fue del 33 % durante 96 h de exposición a 0.1 mg/L de Cu (Canli y Furness, 1993); mientras que Wong *et al.* (1993) observaron un 55 % de mortalidad en postlarvas de *Metapenaeus ensis* al ser expuestos a 8 mg/L durante 48 h.

En el caso de los adultos, Truchot y Rtal (1998) y Naqvi *et al.* (1998) observaron un 50 y 66 % de mortalidad en *Carcinus maenas* y *Procambarus clarkii* expuestos a 2 y 10 mg/L de Cu, respectivamente. Los porcentajes de mortalidad en el presente estudio son menores que los citados en estos trabajos para esas concentraciones; sin embargo, como en el caso del Cd, la salinidad es un factor determina la especie química que domina y por lo tanto, puede alterar la toxicidad del elemento.

En lo que se refiere a la especiación del Cu, Zirino y Yamamoto (1972) y Mantoura *et al.* (1978) concluyeron que la especie química mayoritaria del Cu en agua marina es el  $\text{Cu}(\text{OH})_2$ , con un porcentaje mayor al 90 %, mientras que el  $\text{CuCO}_3$  comprendería menos del 10 % y el ión libre el 1 %, con porcentajes menores de 5 a 6 especies químicas más. Sin embargo, Byrne *et al.* (1988) concluyeron que la principal especie en la fracción inorgánica del Cu disuelto está formada por carbonatos (85 %) seguido por los hidróxidos, los cuales contribuyen con un 8 %, mientras que el ión libre contribuye con un 5 %.

De acuerdo a la literatura, la mortalidad registrada en esta investigación puede explicarse de la siguiente manera: Rainbow *et al.* (1990) y Rainbow (1995) mencionan que los decápodos regulan la concentración de Cu en su cuerpo, pero que si éste excede el valor de 0.1 mg/L en el ambiente, la tasa de captación es mayor que la de excreción y desintoxicación, y la cantidad de Cu en los tejidos aumenta con un consecuente efecto tóxico (Canli y Furness, 1993).

De acuerdo con Truchot y Rtal (1998), la acción tóxica del Cu se hace particularmente evidente en las branquias, con las cuales provoca importantes daños citológicos, alterando funciones esenciales como la regulación iónica y el intercambio gaseoso, con una consecuente alteración de la homeostásis iónica y del balance ácido-base de la hemolinfa.

Además, Bjerregaard y Vislie (1985) y Hansen *et al.* (1992), al someter a *Carcinus maenas* a concentraciones subletales de Cu, encontraron que este elemento disminuye la actividad de la Na, K-ATPasa hasta un 60 %, provocando con esto cambios en los parámetros iónicos y osmóticos de la hemolinfa. Hebel *et al.* (1997) observaron un decremento en la actividad de la piruvato kinasa y en la hexoquinasa (100 y 77 %, respectivamente) en crustáceos expuestos a 10 mg/L Cu; estos decrementos sugieren que la disminución de la energía celular puede ser la causa del efecto tóxico del Cu en crustáceos.

Con respecto al efecto del Cu sobre la fase de ecdysis, en el presente estudio se observó una alta incidencia de mudas. Bjerregaard y Vislie (1985) concluyeron que el Cu puede estimular la muda por dos procesos: aparentemente, concentraciones relativamente altas de Cu inhiben a las proteínas transportadoras del Ca de la hemolinfa al exoesqueleto, de tal manera que la concentración de Ca en la hemolinfa aumenta. De este modo la muda sería estimulada ya que aparentemente el Cu inhibe a la hormona que inhibe la muda, mientras que el aumento de Ca en la hemolinfa estimula a las hormonas de la muda.

Ahsanullah y Ying (1995) observaron que un aumento en la concentración de Cu de 100 a 200 µg/L causó una reducción del crecimiento tanto en *Fenneropenaeus merguensis* como en *Penaeus monodon* y Wong *et al.* (1995) observaron el mismo comportamiento en *Metapenaeus ensis* a 100 µg/L durante 8 días de exposición. Por otro lado, Chen y Lin (2001) al someter a juveniles de *P. monodon* a diferentes concentraciones de Cu (de 0.45 a 4.5 mg/L) observaron que el tiempo requerido para completar el primer ciclo de muda era reducido conforme se incrementaba la concentración de Cu en el ambiente.

En su estudio sobre la toxicidad del Cu para *Orconectes rusticus*, Hubschman (1967) notó que la mortalidad se evidenciaba cuando los organismos alcanzaban la fase de ecdysis, y Bjerregaard y Vislie (1985) observaron el mismo fenómeno en *Carcinus maenas*. De acuerdo con Daly *et al.* (1992) es posible que el estrés de la muda y la toxicidad del cobre se combinen y ejercen un efecto sinérgico; esto podría repercutir en algunos procesos fisiológicos del organismo, que debería ser estudiado con otros experimentos en los cuales se observe el efecto del Cu a concentraciones subletales, y por un periodo mayor.

Con respecto a la sensibilidad de *L. vannamei* en comparación con otras especies de crustáceos, aparentemente este decápodo tiene una mayor tolerancia que el resto de las especies tanto en sus estadios larvarios como en juveniles y adultos (Tabla 34). Sin embargo, como se comentó en el caso del Cd, es importante considerar la salinidad a la cual se llevaron a cabo las pruebas de toxicidad, ya que esto puede dar lugar a especies químicas más tóxicas, por lo cual un mismo crustáceo podría presentar diferentes valores de  $CL_{50}$  a diferentes salinidades.

Como se comentó anteriormente, el Cu ( $CuSO_4$ ) es utilizado como alguicida o fungicida en algunas granjas de peces y camarones en Estados Unidos (Masuda y Boyd, 1993), y dicha práctica es común también en las granjas camaronícolas y en la mayoría de los laboratorios comerciales de producción de larvas de camarón del Noroeste de México en donde se utiliza en sustitución de otros productos antimicóticos, los cuales también están basados en compuestos del cobre (verde malaquita y cutrin, entre otros).

Es posible que esta exposición regular y en varios casos constante a estos compuestos, que se utilizan en concentraciones subletales para el camarón, cause el desarrollo del sistema de defensa de estos organismos, que podría explicar, en dado caso, la posible alta resistencia de las postlarvas que se encontró en este trabajo; aunque un experimento similar al del presente estudio, con diferentes valores de salinidad, aclararía la comparación de la sensibilidad de estas especies.

Cada compartimento celular tiene una concentración óptima para cada metal, que necesita además de mantenerse en estado estable mediante el equilibrio entre las entradas y salidas del metal que se está considerando. Aunque éstas pueden desviarse de su situación ideal, las MT actúan como un sistema amortiguador que captura e inmoviliza metales cuando éstos están en exceso y los libera cuando decrece su disponibilidad. Por ejemplo, las MT pueden regular las concentraciones de Cu durante el ciclo de muda (Engel y Brouwer, 1987), y adicionalmente, estas pueden donar Cu a la apohemocianina y activarlas para el transporte de  $O_2$  (Brouwer *et al*, 1989).

**Tabla 34.** Comparación de CL<sub>50</sub> de Cu obtenida en varias especies de crustáceos.

Especie	CL <sub>50</sub> (mg/L)				Referencia
	24-h	48-h	72-h	96-h	
<i>Paragrapsus quadridentatus</i> (zoea)				0.17	Ahsanullah y Arnott (1978)
<i>Cancer magister</i> (zoea)				0.049	Martin <i>et al.</i> (1981)
<i>Scylla serrata</i> (zoea)		0.08			Ramachandran <i>et al.</i> (1997)
<i>Palaemon serratus</i> (larva)			3.3		Mariño-Balsa <i>et al.</i> (2000)
<i>Maja squinado</i> (larva)			0.05		Mariño-Balsa <i>et al.</i> (2000)
<i>Metapenaeus ensis</i> (postlarva)		4.76			Wong <i>et al.</i> (1993)
<i>Marsupenaeus japonicus</i> (postlarva)				1.95	Bambang <i>et al.</i> (1995)
<i>Litopenaeus vannamei</i> (postlarva)	86.4	56.8	46.08	37.3	Este estudio
<i>Uca annulipes</i> (juvenil)		21.59		9.42	Uma-Devi (1987)
<i>Uca triangularis</i> (juvenil)		13.27		8.28	Uma-Devi (1987)
<i>Palaemonetes pugio</i> (juvenil)		2.1			Burton y Fisher (1990)
<i>Fenneropenaeus merguensis</i> (juvenil)				0.38	Ahsanullah y Ying (1995)
<i>Marsupenaeus japonicus</i> (juvenil)				2.05	Bambang <i>et al.</i> (1995)
<i>Palaemon elegans</i> (juvenil)	249	12.79		3.27	Lorenzon <i>et al.</i> (2000)
<i>Penaeus monodon</i> (juvenil)	15.29	13.15	9.7	7.73	Chen y Lin (2001)
<i>Mysis</i> sp. (adulto)	4.86	2.89	2.04	1.44	Zyadah y Abdel-Baky (2000)

Naturalmente que la rapidez de inducción de las MT en estos procesos, es fundamental para poder tolerar situaciones de estrés por algunos metales. Esta capacidad de inducción es mayor en los tejidos involucrados en la captura, almacenamiento y excreción de metales como las branquias (Roesijadi y Klerks, 1989), las cuales se encontraron constantemente en contacto con el Cu contenido en las soluciones de prueba del presente estudio.

Aunque de manera general, algunos autores han señalado que la forma iónica del Cu es la más tóxica, la toxicidad de este elemento no es exclusivamente por esa especie. Hartung (1973) observó que el Cu particulado resultó ser más tóxico para ciertos peces que el Cu disuelto y Borgmann y Ralph (1983) en un experimento con *Daphnia* sp, demostraron que

la toxicidad del Cu no es sólo una función del ión libre, sino que otras especies químicas son también tóxicas y dicha toxicidad varía entre los organismos. Por este motivo, es importante comentar que en los experimentos llevados a cabo en este trabajo se observaron precipitados, por lo que fue necesario medir la cantidad de Cu disuelto en cada una de las concentraciones de prueba (Tabla 35).

**Tabla 35.** Valores de Cu disuelto (mg/L) determinados por espectrofotometría de absorción atómica en las concentraciones nominales usadas (mg/L) para el presente estudio.

Concentración nominal	Cu disuelto
12	1.1
16	3.82
32	3.85
48	4.79
64	5
80	5.06
96	5.4
112	6.4
128	6.7

Por este motivo se decidió obtener la  $CL_{50}$  como Cu total, puesto que se observaron precipitados en el fondo del recipiente, los cuales estuvieron siempre en contacto con las branquias de organismos de prueba, los cuales pudieron provocar algún efecto deletéreo. Hebel *et al.* (1997) citan un daño ultraestructural en las células de las branquias de *Carcinus maenas*, manifestado por una hiperplasia y necrosis, el cual tuvo consecuencias sobre la regulación iónica y osmótica, y por ende, en los procesos fisiológicos de la respiración y circulación.

### 6.1.3 Fe

Debido a la falta de trabajos específicos sobre la toxicidad de este metal, no fue posible comparar la sensibilidad de *L. vannamei* con otras especies de crustáceos.

Es importante comentar que en los experimentos se observaron precipitados, por lo que fue necesario medir la cantidad de Fe en la fracción disuelta para cada una de las

concentraciones de prueba (Tabla 36). Como en el caso del Cu, el Fe también estuvo en contacto con las branquias, por lo que la  $CL_{50}$  se calculó como Fe total.

Jansen y Groman (1993), los cuales observaron una alta mortalidad en estanques donde se mantenía la langosta *Homarus americanus*, en los cuales determinaron una alta concentración de Fe (disuelto:particulado, 1.3:11 mg/l). Sus observaciones indicaron que en su forma de precipitado (FeOH) este elemento se unía a las branquias de los organismos, provocando una insuficiencia del sistema respiratorio, que según estos autores fue el factor responsable de la mortalidad de las langostas.

Estos precipitados también se observaron en las branquias de las postlarvas de *L. vannamei*, por lo que es probable que las mortalidades observadas sean el resultado de este mismo mecanismo.

**Tabla 36.** Valores de Fe disuelto (mg/L) determinados por espectrofotometría de absorción atómica en las concentraciones nominales usadas (mg/L) del presente estudio.

Concentración nominal	Fe disuelto
30	0.87
40	0.93
45	0.95
50	0.97
55	1.45
60	2.4
65	4.25
70	6.7
80	10.2

De acuerdo con Simkiss y Mason (1983), la ferritina es una proteína encargada del almacenamiento de Fe insoluble, que de esta manera queda disponible para la célula. Se trata de una macromolécula soluble en agua, la cual consiste de una capa externa de sub-unidades apoferritinas y una interna donde alrededor de 4,500 átomos de Fe pueden ser almacenados como oxihidróxido férrico (Aisen y Listowsky, 1980).



En invertebrados, la ferritina ha sido aislada de tejidos de crustáceos y moluscos (Bottke, 1985). Kim *et al.* (1986) determinaron la cantidad de ferritina que circula en el plasma sanguíneo de invertebrados acuáticos, para los cuales se cree que la ferritina provee de hierro para una variedad de funciones celulares. Rama Kumar y Prasad (1999) concluyeron que aquellos organismos que no pueden evitar situaciones tóxicas deben de poseer mecanismos eficientes de defensa y la ferritina puede formar la línea frontal de estos mecanismos. Evidentemente, este sistema pudo haber sido el responsable por la tolerancia al Fe por parte de las postlarvas de *L. vannamei* ha bajas concentraciones de Fe a las que fue expuesta.

#### 6.1.4 Mn

Según Eriksson (2000), el Mn es el octavo metal más abundante del planeta y se encuentra ampliamente distribuido en el agua y la corteza terrestre, siendo muy abundante en los sedimentos marinos. Este elemento es esencial para los organismos marinos, puesto que es utilizado como cofactor enzimático en los procesos de la respiración (Rainbow, 1988).

Con respecto a su especiación química, el ión libre del Mn es la especie química más abundante en el agua marina (90 %), seguida por el MnCl (9 %), y en menor proporción se encuentra asociado a los SO<sub>4</sub> y CO<sub>3</sub> (Mantoura *et al.*, 1978).

Canfield *et al.* (1993) encontraron que los niveles de Mn en el agua intersticial de sedimentos marinos varía de 0.16 a 24 mg/L, lo cual, debido a los hábitos bentónicos de los peneidos que frecuentemente se entierran y se mantienen en contacto directo con el agua intersticial, pudiera causar una acumulación neta de Mn por absorción. Esto fue demostrado por Baden *et al.* (1995), los cuales observaron que *Nephrops norvegicus* incorporaba Mn a través de las branquias cuando se exponía a concentraciones mayores a 1.75 mg/L, que pudiera explicar los efectos encontrados en el presente estudio.

Aunado a lo anterior, el Mn es biodisponible y puede ser fácilmente captado por la fauna bentónica (Eriksson, 1998). Aunque este metal es considerado como esencial por estar incluido en algunas funciones metabólicas de plantas y animales (Silva y Williams, 1991),

se vuelve tóxico cuando se encuentra a altas concentraciones y deteriora algunos procesos fisiológicos, como los relacionados con el funcionamiento del sistema neuromotor (Baden y Neil, 1998).

Sin embargo, y de acuerdo con Lasier *et al.* (2000), muy poca investigación ha sido llevada a cabo sobre la toxicidad del Mn en organismos acuáticos. Este elemento es abundante en los sedimentos, y dada las condiciones químicas que ahí prevalecen el Mn es convertido a su forma soluble, la cual es más tóxica, y altas concentraciones han sido reportadas en el agua intersticial (75 mg/L) (Brumbaugh *et al.*, 1994).

Esto es un factor importante ha considerar, puesto que algunos laboratorios de producción de postlarvas de camarón, utilizan filtro de arena (sedimentos marinos costeros) al tomar el agua marina para su uso cotidiano, la cual podrían tener concentraciones relativamente altas de Mn.

**Tabla 37.** Comparación de CL<sub>50</sub> de Mn obtenida en varias especies de crustáceos.

Especie	CL <sub>50</sub> (mg/L)				Referencia
	24-h	48-h	72-h	96-h	
<i>Ceriodaphnia magna</i> (zoea)		15			Lasier <i>et al.</i> (2000)
<i>Hyalella azteca</i> (larva)		3			Lasier <i>et al.</i> (2000)
<i>Litopenaeus vannamei</i> (postlarva)	246	178	148	130	Este estudio

Aunado a lo anterior, la toxicidad del Mn ha sido subestimada, por lo que una muy limitada investigación ha sido llevada a cabo en establecer la toxicidad de este elemento en organismos acuáticos (Lasier *et al.*, 2000), razón por la cual, pocos trabajos fueron incorporados para la presente discusión (Tabla 37).

### 6.1.5 Hg

El Hg, el Cd y el Pb son los tres metales pesados ampliamente reconocidos como los más tóxicos (Landis y Yu, 1999) y aparentemente los crustáceos acuáticos son los organismos más sensibles al Hg (Eisler, 1973).

Los datos de estas pruebas parecen indicar una desaceleración de la mortalidad después de las primeras 48 h, que pudiera ser debido a una activación de los mecanismos de defensa de los organismos de prueba. Esto concordaría con los resultados de otros autores, como por ejemplo Johnson y Gentile (1979) los cuales, en un ensayo llevado a cabo con larvas de *Homarus americanus*, observaron una más rápida respuesta, medida en términos de mortalidad, durante las primeras 48 h de exposición a Hg y Cd.

Como se mencionó previamente, el mecanismo de defensa sería una inducción a la síntesis de metalotioneínas (Roesijadi y Robinson, 1994) cuyo efecto, según Kraus *et al.* (1988) se daría después de 48 h de exposición al estímulo. Por este motivo, la medida de esta inducción ha sido propuesta como un indicador celular de la exposición y toxicidad de metales en animales acuáticos (Roesijadi y Robinson, 1994), que sería necesario cuantificar con un estudio más detallado, mediante el cual se cuantifique el tiempo que requieren las postlarvas de *L. vannamei* para la inducción de estas proteínas y de esta forma conocer la rapidez de respuesta para este tipo de estrés.

Comparando los datos que se encontraron en este estudio con los que existen en la literatura, *L. vannamei* tiene una mayor tolerancia al Hg que otros crustáceos, ya que Canli y Furness (1993) observaron un 80 % de mortalidad en juveniles de *Nephrops norvegicus* expuestos a 0.1 mg/L de Hg durante 96 h y Bianchini y Gilles (1996), quienes midieron la toxicidad del mercurio para los decápodos *Eriocheir sinensis*, *Carcinus maenas* y *Cancer pagurus*, observaron un 50 % de mortalidad después de 96, 72 y 48 h de exposición a 1 mg/L de Hg, respectivamente.

Uno de los principales efectos del Hg (y otros elementos como el Cd, Zn y Cu), es que éste puede ser acumulado en las branquias (y en otros tejidos externos) e inhibir la enzima responsable de la bomba Na/K (Na/K-ATPasa) provocando un deterioro en el mantenimiento de la osmolaridad de la hemolinfa (Péqueux *et al.*, 1995).

Krishnaja *et al.* (1987) observaron cambios histopatológicos en el hepatopáncreas de *Scylla serrata* expuesto a 0.32 mg/L de Hg, lo cual es de vital importancia fisiológica ya que en

los crustáceos, este órgano es el responsable de la secreción de enzimas digestivas y de absorber y transformar el alimento. Además, Rao (1989) observó una disminución del metabolismo oxidativo en presencia de Hg, indicando un efecto adverso en la función mitocondrial que se traduce en un decremento en la producción de energía, debido a la gran cantidad de enzimas que dependen de grupos sulfhidrilos (SH) para los cuales el Hg tiene una gran afinidad.

De acuerdo con varios autores, la mayor sensibilidad a sustancias tóxicas de larvas y juveniles de crustáceos estaría relacionada con su mayor frecuencia de mudas (Rao *et al.*, 1985; Dall *et al.*, 1990), que no parece ser el caso para *L. vannamei* y este metal. Sin embargo, Stevenson (1986) y Keteles y Fleeger (2001) concluyeron que la quitina y proteínas asociadas (con grupos S, N y OH) contenidas en el exoesqueleto de decápodos capturan algunos elementos como Hg, Cd y Zn. En vista de que durante la preecdysis el organismo libera elementos del exoesqueleto a la hemolinfa, se causaría un incremento en la concentración interna de Hg, facilitando el efecto tóxico de este elemento.

Aunado a lo anterior, Weeks *et al.* (1992) observaron que la fase de ecdysis puede determinar la concentración de metales y la distribución entre los diversos tejidos y el exoesqueleto en decápodos. Incluso, el exoesqueleto de los crustáceos puede incorporar metales desde la hemolinfa y contribuir a su eliminación (Keteles y Fleeger, 2001), que debería ser corroborado mediante un experimento con isótopos diseñado específicamente para este fin.

En la tabla 38 resalta la alta tolerancia de las postlarvas de *L. vannamei* al Hg total, la cual es mayor que para los estadios larvarios y juveniles del resto de los crustáceos en los cuales se estudió el efecto de este metal. Inclusive es menos sensible que el resto de los demás crustáceos en su fase adulta, con la excepción de *Palaemonetes pugio* (Kraus y Kraus, 1986) cuya CL<sub>50-96 h</sub> es de 2.6 mg/L. Sin embargo, es importante considerar el punto isosmótico de las especies en cuestión, lo que modificaría su respuesta al Hg (Pequeux, 1995).

**Tabla 38.** Comparación de CL<sub>50</sub> de Hg obtenida en varias especies de crustáceos.

Especie	CL <sub>50</sub> (mg/L)				Referencia
	24-hr	48-hr	72-hr	96-hr	
<i>Cancer magister</i> (zoea)				0.008	Martin <i>et al.</i> (1981)
<i>Palaemon serratus</i> (larva)			0.074		Mariño-Balsa <i>et al.</i> (2000)
<i>Maja squinado</i> (larva)			0.072		Mariño-Balsa <i>et al.</i> (2000)
<i>Homarus gammarus</i> (larva)		0.048			Mariño-Balsa <i>et al.</i> (2000)
<i>Litopenaeus setiferus</i> (postlarva)				0.017	Green <i>et al.</i> (1976)
<i>Litopenaeus vannamei</i> (postlarva)	1.76	1.4	1.27	1.23	Este estudio
<i>Uca annulipes</i> (juvenil)		0.10		0.064	Uma-Devi (1987)
<i>Uca triangularis</i> (juvenil)		0.147		0.072	Uma-Devi (1987)
<i>Palaemon elegans</i> (juvenil)	9.54	3.54		0.67	Lorenzon <i>et al.</i> (2000)
<i>Palaemonetes pugio</i> (adulto)				2.6	Kraus y Kraus (1986)
<i>Scylla serrata</i> (adulto)	0.93	0.80	0.68	0.68	Krishnaja <i>et al.</i> (1987)
<i>Paratelphusa hydrodromus</i> (adulto)			0.39	0.35	Ananthalakshmikumari <i>et al.</i> (1990)

Con respecto a las formas químicas del Hg en el agua marina, Mantoura *et al.* (1978) señalaron que el 99 % del Hg se asocia a los Cl, mayoritariamente como HgCl y en menor proporción a los Br<sup>-</sup>, aunque posteriormente Turner *et al.* (1981) calcularon que el 100 % del Hg en agua marina se asocia a los Cl, tópico que debe ser considerado en este tipo de pruebas.

### 6.1.6 Pb

El amplio uso de diversos compuestos que contienen Pb y su subsecuente introducción en los cuerpos acuáticos es un factor que puede tener repercusiones fisiológicas para varios organismos acuáticos (Tulasi y Ramana Rao, 1989). De acuerdo con Prosi (1989), el Pb es el metal de mayor movilización antropogénica, con su consecuente progresivo incremento en los cuerpos acuáticos.

Sobresale la alta tolerancia del camarón blanco (*L. vannamei*) al Pb, puesto que solo a partir de 60 mg/L se observó mortalidad en los organismos de prueba. Spehar *et al.* (1978) al someter a una prueba de toxicidad aguda al anfípodo *Gammarus pseudolimnaceus*, observaron una mortalidad mayor al 50 % después de 96 h de exposición a partir de 136 µg/L de Pb. Por su parte, Canli y Furness (1993) en un experimento llevado a cabo en juveniles de *Nephrops norvegicus* observaron un 16 % de mortalidad a las 96 h de exposición continua a 1 mg/L de Pb, y en cuanto al motivo de la toxicidad, Chinni *et al.* (2000) al exponer a concentraciones letales de Pb a postlarvas de *Fenneropenaeus indicus*, concluyeron que la mortalidad ocurrió debido a una alteración en el epitelio branquial. Esto causó un estancamiento en la perfusión de la hemolinfa inhibiendo con ésto el intercambio gaseoso.

Existe un incremento en la evidencia de que a largo plazo, niveles subletales de Pb pueden disminuir la biodiversidad y eventualmente provocar la extinción de algunas especies (Kime, 1995). De acuerdo con Jain *et al.* (1996), este elemento inactiva varias enzimas de la glicólisis en varios tejidos y observaron que el Pb se acumula principalmente en las branquias y en los tejidos con alto contenido de Ca, como el exoesqueleto.

En la Tabla 39 se comparan los resultados de este trabajo con los que se encontraron en la literatura sobre la toxicidad de este metal para diferentes crustáceos. Considerando globalmente estos valores, las postlarvas de *L. vannamei* presentan una sensibilidad al Pb muy cercana a la de juveniles de *Palaemon elegans* y notablemente inferior a la de los juveniles del cangrejo rojo de río (*Procambarus clarkii*) y los adultos de *Scylla serrata*, aunque las larvas de *Cancer magister* y el anfípodo *Gammarus pseudolimnaeus* resultaron ser sensitivas a concentraciones de aproximadamente tres órdenes de magnitud inferiores.

Es importante comentar que los precipitados observados en el experimento, indujeron la formación de sales y por lo tanto una reducción considerable en la biodisponibilidad del Pb, por lo que se podría sobre evaluar la toxicidad del Pb, aunque en los laboratorios de producción de larvas de camarón que utilicen agua marina (como la mayoría), por dicho ambiente químico, esas serían las especies químicas y la toxicidad de las mismas.

**Tabla 39.** Comparación de CL<sub>50</sub> de Pb para varias especies de crustáceos.

Especie	CL <sub>50</sub> (mg/L)				Referencia
	24-hr	48-hr	72-hr	96-hr	
<i>Cancer magister</i> (zoea)				0.575	Martin <i>et al.</i> (1981)
<i>Litopenaeus vannamei</i> (postlarva)	209.6	179.9	160.6	134	Este estudio
<i>Procambarus clarkii</i> (juvenil)				751	Naqvi y Howell (1993)
<i>Palaemon elegans</i> (juvenil)	5623	2399		167	Lorenzon <i>et al.</i> (2000).
<i>Gammarus pseudolimnaeus</i> (adulto)				0.124	Spehar <i>et al.</i> (1978)
<i>Scylla serrata</i> (adulto)				>370	Krishnaja <i>et al.</i> (1987)

### 6.1.7 Zn

Rainbow (1995), señaló que la concentración interna de Zn de los crustáceos decápodos se mantiene relativamente constante (dentro de un relativo intervalo de concentraciones) cuando son expuestos a diversas concentraciones de Zn. Sin embargo, como en el caso del Cu, esa capacidad de regulación es finita y cuando los organismos son expuestos a las concentraciones elevadas que se utilizan para las pruebas de toxicidad aguda, la tasa de captación del metal es superior a la tasa de excreción, resultando en una acumulación del contaminante (White y Rainbow, 1984).

Canli y Furness (1993) no registraron mortalidad en juveniles de *Nephrops norvegicus* expuestos a 2 mg/L de Zn durante 96 h, concentración que coincide aproximadamente con la CL<sub>50</sub>-96 h que se encontró en este trabajo para postlarvas de *L. vannamei*.

También se encontró una disminución significativa de la actividad de la Na-K-ATPasa en las branquias posteriores de los cangrejos *Carcinus maenas* y *Eriocheir sinensis* cuando éstos fueron expuestos a Zn (Haya *et al.*, 1983). Esto puede indicar que hay un número determinado de sitios activos presentes en la molécula de la enzima y que una interacción total entre estos sitios y el Zn produce una inhibición parcial de su actividad cercana al 50 % (Bianchini y Carvalho de Castilho, 1999).

Por otro lado, Crespo (1984) concluyó que a una concentración letal del Zn induce daños citológicos a las branquias y la causa fisiológica de muerte puede estar relacionada con un desequilibrio de los procesos respiratorios y osmoreguladores; que es lo que presumiblemente ocurrió en los experimentos con postlarvas de *L. vannamei*.

Según Bianchini y Carvalho de Castilho (1999) los valores de la CL<sub>50</sub> para invertebrados acuáticos varía entre 0.5 y 15 mg/L, intervalo en el que se encuentran los resultados de este trabajo, aunque los datos que se presentan en la tabla 40 indican límites máximos y mínimos notablemente superiores al mencionado, inclusive para todos los organismos juveniles, entre los que destaca en manera particular la alta tolerancia del peneido *Litopenaeus setiferus* como lo señala Vanegas *et al.* (1997).

**Tabla 40.-** Comparación de CL<sub>50</sub> de Zn obtenida en varias especies de crustáceos.

Especie	CL <sub>50</sub> (mg/L)				Referencia
	24-hr	48-hr	72-hr	96-hr	
<i>Paragrapsus quadridentatus</i> (zoea)				1.23	Ahsanullah y Arnott (1978)
<i>Cancer magister</i> (zoea)				0.456	Martin <i>et al.</i> (1981)
<i>Portunus pelagicus</i> (zoea)		0.56-0.6			Greenwood y Fielder (1983)
<i>Portunus sanguinolentus</i> (zoea)		0.6-0.7			Greenwood y Fielder (1983)
<i>Litopenaeus vannamei</i> (postlarva)	22.3	8.67	3.48	2.08	Este estudio
<i>Uca annulipes</i> (juvenil)		40.6		31.9	Uma-Devi (1987)
<i>Uca triangularis</i> (juvenil)		46.1		39	Uma-Devi (1987)
<i>Palaemonetes pugio</i> (juvenil)		11.3			Burton y Fisher (1990)
<i>Litopenaeus setiferus</i> (juvenil)				43.8	Vanegas <i>et al.</i> (1997)
<i>Palaemon elegans</i> (juvenil)		166		26.3	Lorenzon <i>et al.</i> (2000)
<i>Callinassa australiensis</i> (adulto)				10.2	Ahsanullah <i>et al.</i> (1981)
<i>Callinectes similis</i> (adulto)				6.3-11	Ramírez <i>et al.</i> (1989)
<i>Chasmagnathus granulata</i> (adulto)				15.7	Bianchini y Carvalho de Castilho (1999)



Sobresale el hecho de que los organismos expuestos a 2.5 mg/L, 23 alcanzaron la fase de ecdysis y 23 postlarvas murieron, lo que refleja una clara relación entre toxicidad con la fase de ecdysis. Keteles y Fleeger (2001) al exponer al Zn a *Palaemonetes pugio*, concluyeron que la alta mortalidad durante la fase de ecdysis que sufrió esa especie durante las pruebas de toxicidad podría ser atribuido a un incremento en el nivel de concentración en los tejidos por la redistribución de ciertos elementos previos a la ecdysis, aunado a la captación de agua que acompaña este proceso, la cual contribuyó a incrementar la concentración de Zn en los tejidos de las postlarvas de *L. vannamei*.

Con respecto a su especiación química y de acuerdo con Mantoura *et al.* (1978), el ion libre del Zn es la especie química más abundante en agua marina (80%), seguida por el ZnCl (20%), y en menor proporción asociado a los SO<sub>4</sub>, CO<sub>3</sub> y OH; especies químicas que prevalecieron durante el presente estudio.

#### 6.1.8 Orden de toxicidad

Con base en los resultados que se comentaron en los incisos anteriores, el nivel de toxicidad de los siete metales estudiados se puede ordenar de la siguiente manera:



De acuerdo con Krishnaja *et al.* (1987) el mercurio es el elemento más tóxico de la presente serie, que quedó confirmado en este trabajo. Sin embargo, hay una variación considerable en este orden, que depende de las diferentes respuestas de las especies estudiadas (Eisler, 1977; Canli y Furness, 1993).

En concordancia con lo anterior, McLeese (1974), Eisler y Hennekey (1977), Ahsanullah y Arnott (1978), Ahsanullah *et al.* (1981) y McLusky y Hagerman (1987) observaron los siguientes órdenes de toxicidad en diferentes especies acuáticas: Cu > Zn > Pb; Hg > Cd > Zn; Cd > Zn; Cu > Cd > Zn y Hg > Cd > Cu > Zn > Pb, respectivamente.

En los diferentes ordenes de toxicidad citados anteriormente, el Cd presenta un mayor nivel de toxicidad que el Zn, sin embargo, en el presente estudio esto no ocurrió así. De acuerdo

con Eisler y Hennekey (1977) esta variabilidad interespecífica de la tolerancia a metales pesados bajo condiciones de laboratorio está en función de la disponibilidad del tóxico así como a las inherentes diferencias genéticas de cada especie o población, coincidiendo en esto con Levinton (1980) el cual sugirió que la habilidad para resistir los efectos dañinos de los metales pesados puede estar relacionada con una adaptación genética de la especie.

Aunado a lo anterior, Kraus *et al.* (1988) no observaron irregularidades en el desarrollo de larvas de *Palaemonetes pugio*, sometidas a concentraciones subletales de Hg. Estos resultados contrastan con los publicados por Shealy y Sandifer (1975), quienes notaron varios defectos en el desarrollo de *Palaemonetes vulgaris* expuesto a HgCl<sub>2</sub>, demostrando que la sensibilidad/tolerancia a los metales varía entre las especies.

Naturalmente que para desarrollar la adaptación a una mayor tolerancia al Cd que al Zn, *L. vannamei* tendría que estar previamente expuesta al Cd, lo que le daría la capacidad de desarrollar una mayor resistencia a la presencia de este elemento.

Páez-Osuna y Marmolejo-Rivas (1990) y Páez-Osuna *et al.* (1994), que estudiaron el nivel de concentración de algunos metales pesados en diferentes cuerpos de aguas costeros del Noroeste de México, encontraron niveles de Cd relativamente elevados de hasta 30 µg/l, que pudiera ser la explicación de la diferencia del nivel de toxicidad entre el Cd y el Zn, que no coincide con las escalas de toxicidad mencionadas anteriormente.

Esto ha sido previamente demostrado por Kraus *et al.* (1988), quienes observaron una mayor tolerancia al Hg en poblaciones de *Palaemonetes pugio* ubicadas cerca de una zona industrializada contaminada con Hg, en comparación con las de otras zonas relativamente "limpias" (prístinas). Moraitou-Apostopoulou *et al.* (1982) observaron el mismo fenómeno en poblaciones de *Palaemon elegans*, en el caso de Cd y Cr.

Sin embargo, pese a que el Zn es considerado un elemento esencial para diversos procesos fisiológicos de la fauna acuática, varios estudios han demostrado que, cuando está presente en altas concentraciones, el Zn puede alcanzar niveles de toxicidad (Crespo, 1984) y que

además los crustáceos son un grupo muy sensible a los efectos de este metal (Eisler y Hennekey, 1977). Sin embargo, en las tablas 2 y 15 se puede apreciar que a 1 mg/L, el porcentaje de mortalidad es mayor en el caso del Cd, mientras que el Zn se vuelve más tóxico cuando las concentraciones superan este nivel.

Esto es un claro ejemplo de hormesis, con diferentes comportamientos a diferentes concentraciones, siendo de estimulación a diversos procesos fisiológicos a bajas concentraciones; y de inhibición a altos valores (Calabrese y Baldwin, 1998).

De manera general, se pudiera esperar una diferencia en la tolerancia/sensibilidad a metales entre los camarones y los cangrejos. Sin embargo, al analizar las tablas aquí presentadas, se observó que existe una amplia variación de respuestas a los metales; por ejemplo, el camarón juvenil *Farfantepenaeus duorarum* tiene una respuesta al Cd muy similar a los juveniles de *Callinectes similis*, y mayor que la del juvenil *Procambarus clarkii*. A nivel larvario *Palaemones pugio* y *Palaemon serratus* presentaron una mayor tolerancia que los estadios larvarios de los cangrejos *Cancer magister* y *Scylla serrata*.

Con respecto al Cu, aparentemente los cangrejos poseen una mayor tolerancia, pero los juveniles de *Penaeus monodon* tiene una respuesta muy similar a la del cangrejo violinista. Y lo mismo ocurre con el Zn, donde *L. setiferus* posee una mayor tolerancia que los cangrejos, pero otros camarones como los del género *Palaemon* y *Palaemonetes* presentan una tolerancia menor que la de algunos cangrejos.

Esto demuestra que la tolerancia a los metales pesados depende de la fisiología particular de cada especie, la cual está en función a las condiciones del hábitat de dichas especies (Kraus *et al.*, 1988).

Las características iónicas de los metales pueden servir para predecir su tendencia a unirse a algún tipo de biomolécula y con eso predecir también su toxicidad (Magwood y George, 1996). Por ejemplo, McCloskey *et al.* (1996) observaron que la electronegatividad y el radio atómico reflejan la tendencia de unirse a ligandos con donadores de O y S y Tatara *et*

al. (1998) usaron estas características de 18 metales en un modelo mediante el cual pudieron predecir con éxito la  $CL_{50}$  a 24 h de 17 de los 18 metales (Li, Na, Mg, K, Ca, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Sr, Cd, Cs, Ba, La, y Pb) aunque el modelo no resultó efectivo para períodos mas largos de exposición del organismo de prueba, que en este caso fue el nemátodo *Caenorhabditis elegans*.

En las figuras 1-7 se presentan las ecuaciones que predicen la mortalidad a un tiempo dado (24, 48, 72 y 96 h) de una población de postlarvas de *L. vannamei* expuestas a diferentes concentraciones de Cd, Cu, Fe, Hg, Mn, Pb y Zn. Estas ecuaciones fueron obtenidas de acuerdo al comportamiento que describe la línea Probit cuando se relacionan la mortalidad Probit contra el tiempo de exposición al metal (Finney, 1971) y en función al ajuste estadístico que esta tiene ( $\chi^2$ ; Hubert, 1992).

## 6.2 Pruebas de toxicidad con Mezclas

De acuerdo con Vermeulen (1995) la toxicidad de una mezcla es determinada por la naturaleza del tóxico, su concentración, además de la temperatura, la dureza del agua, la duración de la exposición y el tipo de organismo de prueba. Este último factor está aparentemente entre los más importantes debido a la diversidad de la toxicocinética de metales que se ha descrito para las diversas especies estudiadas.

### 6.2.1 Cd-Hg

Existen muchas evidencias de que los metales traza como el Hg y el Cd son captados por los organismos cuando estos elementos se encuentran en el medio, siendo las branquias uno de los principales tejidos involucrados en la captación de metales (Roesijadi y Klerks, 1989).

Esta facilidad para ser captados e introducidos al organismo facilita que se manifiesten efectos tóxicos aún a bajas concentraciones. Weis (1978) observó que aunque estos elementos compiten por el mismo sitio, su alta afinidad a compuestos SH incrementa su toxicidad cuando se encuentran en el medio a concentraciones relativamente altas, lo que explica el efecto de sinergismo observado en el presente estudio.

El mismo efecto de sinergismo fue observado también por Mohan *et al.* (1986) pero en el mejillón *Perna viridis*, lo cual demuestra que estos metales pueden ejercer su efecto tóxico en un amplio número de organismos expuestos simultáneamente a estos elementos, aún en el caso de especies que pertenecen a phyla diferentes.

En la tabla 24 se pudo apreciar el hecho de que cuando las postlarvas son expuestas a concentraciones de Cd y Hg equivalentes a bajas UT (0.05-0.25 UT), la mortalidad se mantiene constante a partir de 84 h de exposición. Aparentemente, con esas fracciones de la UT, a ese tiempo de exposición empieza la síntesis de metalotioneínas, las cuales ejercen su papel de protección contra estos metales; ya que, de acuerdo con Carpene (1993), ambos elementos inducen la síntesis de estas metaloproteínas.

Con respecto al efecto que la mezcla tuvo sobre el ciclo de muda, Fingerman *et al.* (1996) observaron que la interacción de Cd y Hg redujo significativamente la ecdysis en *Uca pugilator* y *Uca pugnax*. Este efecto se notó claramente en los organismos expuestos a 0.05 UT, puesto que solo 4 organismos alcanzaron la fase ecdysis, en comparación con los 23 del testigo. Entre 0.10 y 0.25 UT mudaron entre 16 y 17 postlarvas, que disminuyeron a entre 8 y 12 para el intervalo de 0.5 a 4 UT, aunque en estos últimos casos puede considerarse como el resultado de una fuerte situación de estrés, ya que de hecho se notó durante las primeras horas de exposición.

### 6.2.2 Cd-Zn

Zatta (1984) observó que en la hemolinfa de *Carcinus maenas*, la hemocianina puede funcionar como un transportador de iones metálicos, teniendo en cuenta que la hemocianina representa alrededor del 95 % de las proteínas de la hemolinfa en ese decápodo. Así mismo, este autor encontró que la hemocianina es capaz de captar otros iones como el Cd, ya que tiene una baja constante de afinidad, que la identifica como una proteína de transporte de diferentes elementos.

Por lo tanto, es probable que la hemocianina de las postlarvas de *Litopenaeus vannamei* haya retenido tanto al Cd como al Zn en la hemolinfa, pero que esta capacidad resultó

insuficiente cuando los organismos fueron expuestos a concentraciones de Cd y Zn equivalentes a 1 y 2 UT, con las cuales ya se presentaron mortalidades.

Además, De Conto Cinier *et al.* (1998) observaron que cuando el organismo es expuesto a Cd, este ion en el citosol puede desplazar al Zn (y en ocasiones al Cu) del respectivo sitio, provocando con esto una alteración de la estructura no tioneína, con un correspondiente daño celular.

En términos generales, la reducción del número de mudas con esta mezcla coincide con las observaciones de Fingerman *et al.* (1996) los cuales encontraron que, como en el caso de la mezcla Cd-Hg, la de Cd-Zn afecta negativamente el ciclo de muda del cangrejo violinista *Uca pugilator*.

Cañizares-Villanueva *et al.* (2000) al someter al *Daphnia magna* a la mezcla de Cd-Zn, también observaron antagonismo, mientras que Thorp y Lake (1974) y Kraak (1992) observaron simple adición en el camarón dulceacuícola *Paratya tasmaniensis* y en el mejillón zebra *Dreissena polymorpha*, respectivamente. Sin embargo, en los crustáceos marinos *Callinassa australiensis* y *Litopenaeus setiferus*, Negilski *et al.* (1981) y Vanegas *et al.* (1997) observaron claros efectos de sinergismo. Esta observación se contrapone al antagonismo observado en *L. vannamei*, lo cual puede ser explicado por diferencias genéticas y/o ambientales inherentes a cada especie.

### 6.2.3 Zn-Hg

Eisler (1981) concluyó que en el 95 % del Hg que llega a la hemolinfa de los crustáceos es unido a las proteínas circundantes y un fenómeno similar ha sido observado en el caso del Zn por Roesijadi (1980).

Esto es un factor muy importante en la toxicodinámica de estos elementos, ya que puede explicar como el efecto tóxico puede ser disminuído inicialmente. Con UT elevadas las proteínas de la hemolinfa ya no serían capaces de llevar a cabo su papel protector, que es

muy probablemente la explicación que se encontró en las pruebas de toxicidad de esta mezcla.

Con base en el comportamiento observado con la UT más elevada, se puede pensar que el Zn ejerce un efecto protector contra el Hg en las postlarvas de *L. vannamei*. Esta conclusión coincide con la expresada por McLusky y Hagerman (1987), los cuales observaron que la  $LT_{50}$  (tiempo letal medio) para el misidáceo *Praunus flexuosus* aumentaba conforme incrementaba la concentración de Zn en el medio. Evidentemente se requiere de un estudio más detallado para verificar si efectivamente el Zn de alguna manera contrarresta el efecto tóxico del Hg en estos organismos, que pudiera ser confirmado variando las concentraciones relativas de los dos metales presentes en la mezcla.

Como en las mezclas anteriores, Fingerman *et al.* (1996) también observaron una reducción muy pronunciada del ciclo de muda en los cangrejos *U. pugilator*, que en este caso se hizo especialmente evidente a partir de 0.35 UT, quedando por investigar la probabilidad de una respuesta especial en el caso de 0.15 UT.

#### 6.2.4 Cu-Zn

Para el caso específico de Cu y Zn y de acuerdo con Fletcher y Fletcher (1980), encontraron que cuando un organismo es expuesto a concentraciones relativamente altas de dichos elementos, estos se unen a las proteínas del plasma, las cuales pueden tener una importante función en el transporte de metales como ocurre también con el Cd. Sin embargo, cuando la concentración de esos metales aumenta en la hemolinfa se sobrepasa su capacidad, los metales se unen a otras estructuras y sobrevienen los efectos tóxicos.

Duodoroff (1952) observó un claro ejemplo de sinergismo en peces. Recientemente, Zyadah y Abdel-Baky (2000) encontraron que la tolerancia de los alevines de *Mugil cephalus* era incrementada cuando este era expuesto a la mezcla de Cu-Zn que cuando se exponían a cada metal de manera individual, y el mismo antagonismo fue reportado por Kraak (1992) en el caso del mejillón *Dreissena polymorpha* y para el crustáceo *Callinassa*

*australiensis* por Negilski *et al.* (1981); así como Botton *et al.* (1998) con larvas de *Limulus polyphemus*.

Todo esto indica, como ya se mencionó para otras mezclas, que la respuesta de los organismos puede variar de acuerdo a su pertenencia a una determinada entidad o categoría taxonómica, que puede ser el resultado de diferencias en las tasas de absorción para diferentes concentraciones externas y condiciones de prueba (Negilski *et al.*, 1981) o a la sustitución y/o competencia entre el Cu y el Zn por los sitios disponibles de las proteínas/enzimas o durante la síntesis de éstas (Abdel-Moati y Farag, 1991).

### 6.3 Experimento con diferentes factores de aplicación

Se han descrito varias formas para estimar las concentraciones de seguridad de un contaminante, que son obviamente valores inferiores a la concentración letal media, que expresa más bien la capacidad de una especie a sobrevivir eventos tóxicos de corta duración, sin que esto implique la capacidad de desenvolverse normalmente en presencia de cantidades subletales del tóxico considerado.

De hecho, ya Tarzwell (1962) comentó en el período inicial de los estudios ecotoxicológicos, que el objetivo principal de las investigaciones sobre efectos letales y subletales es el de predecir los niveles de concentración de un contaminante que son seguros bajo condiciones continuas de exposición.

De acuerdo con esto, Buikema *et al.* (1982) concluyeron que una prueba de toxicidad aguda provee información precisa acerca de la toxicidad aguda de una sustancia, droga o veneno en condiciones determinadas, pero no puede predecir adecuadamente una concentración que no tenga algún efecto subletal o crónico sobre los organismos, es decir, una concentración que permita que los organismos puedan prosperar normalmente y no sólo sobrevivir (Bartholomew, 1964).

De acuerdo con lo anterior y después de una serie de experimentos, Sprague (1971) concluyó que el nivel de seguridad (concentración de un contaminante que no tenga a largo



plazo un efecto adverso sobre los organismos) puede ser obtenido multiplicando el valor de la  $CL_{50-96}$  h por un factor de aplicación de 0.1. Este factor de aplicación de 0.1 se obtuvo mediante procedimientos estadísticos y se deriva de una serie de experimentos en los que no se observaron daños sobre diferentes funciones fisiológicas como la reproducción, la respiración, el crecimiento y la susceptibilidad a enfermedades, entre otros.

Este mismo factor fue aplicado por varios autores (Buikema *et al.*, 1982; Chen *et al.*, 1990; Frías-Espéricueta *et al.*, 1999) para tóxicos diferentes, pero sin considerar el tipo de sustancia y las actuales interacciones con otros que pudieran estar presentes en el ambiente, de tal manera que el poder predictivo de resultados obtenidos mediante el uso de este factor, pudiera verse fuertemente sesgado y es justamente por este motivo que el estudio de los efectos combinados de diferentes tóxicos ha sido ampliamente reconocidos como un aspecto importante de la evaluación ecotoxicológica de los metales (Enserink *et al.*, 1991).

Los resultados del presente estudio, indican claramente que a medida que se incrementó el FA, se redujo el crecimiento de los organismos expuestos. Esta observación está en concordancia con Spehar y Fiandt (1986), quienes observaron que la mezcla de seis metales redujo el crecimiento y la reproducción en *Ceriodaphnia dubia*. Así mismo, Enserink *et al.* (1991) observaron que el principal efecto subletal para el cladóceros *Daphnia magna* de la mezcla de As, Cd, Cr, Cu, Hg, Ni, Pb y Zn, fue la reducción del crecimiento.

Simpson (1979) y Ramírez *et al.* (1989) observaron que, cuando los organismos son expuestos a metales, estos concentran sus energías en los procesos de biosíntesis de proteínas detoxificadoras, por lo cual disminuye el crecimiento. Evidentemente, los resultados de estos experimentos presentan diferencias en sensibilidad a los metales por parte de las postlarvas de *L. vannamei*, la cual fue considerablemente más baja que las presentadas durante los experimentos individuales. Estos resultados están en concordancia con Pedersen y Petersen (1996) los cuales observaron la misma tendencia con cinco organismos diferentes y de 5 a 20 sustancias utilizadas como tóxicos.

ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA

Es de vital importancia el conocimiento de los límites de tolerancia para los estadios más vulnerables de las especies, debido a que estos datos pueden ser relevantes en las consideraciones del control de la contaminación (Greenwood y Fielder, 1983; APHA, 1989). Greenwood y Fielder (1983) recomendaron que la concentración máxima de Zn y Cd en aguas marinas y estuarinas debe ser obtenido al multiplicar la  $CL_{50-96}$  h por un factor de aplicación de 0.01. Este mismo factor fue utilizado por Ahsanullah y Arnott (1978) y Ahsanullah *et al.* (1981).

Por lo anterior, dado los resultados obtenidos y utilizando el factor de aplicación de 0.01, las máximas concentraciones de Cd, Cu, Fe, Hg, Mn, Pb y Zn en el agua de mar de los laboratorios de cultivo de larvas de *Litopenaeus vannamei*, son de 25, 343, 442, 12.4 1300, 1342 y 20.7  $\mu\text{g/L}$ , respectivamente. De acuerdo con la EPA (1979) la concentración de mínimo riesgo recomendada para Zn, Cd y Cu son de 20, 0.2 y 10  $\mu\text{g/L}$ , en el orden, aunque estos valores varían en función de la tolerancia de cada especie. Por ejemplo, Eisler y Hennekey (1977) observaron que la concentración de 10  $\mu\text{g/L}$  de Hg no fue letal para algunas especies de cangrejos adultos, y Canli y Furness (1993) demostraron que una concentración de 120  $\mu\text{g/L}$  de Cd no tuvo algún efecto adverso sobre los decápodos *Palaemonetes pugio* y *Pagurus longicarpus* durante 30 días de exposición continua, aunque estos autores no consideraron el sinergismo de los metales, lo cual pudiera alterar notablemente sus resultados.

Ortiz *et al.* (1999) sometieron al pez *Fundulus heteroclitus* a concentraciones subletales de Cu (800  $\mu\text{g/L}$ ) durante 30 días, y observaron una necrosis branquial y hepática, además de una mayor concentración de Cu en el hígado que en las branquias, lo cual parece reflejar el papel multifuncional de este órgano, tanto en los procesos de desintoxicación como en los de acumulación.

Por otro lado, Malik *et al.* (1998) sometieron al pez *Chana punctatus* a concentraciones subletales de Zn (2.4 mg/L) durante 60 y 120 días, y observaron que el Zn produjo cambios notables en la composición química (glucógeno, proteínas y lípidos) en el hígado y en el músculo.

Estos autores concluyeron que la disminución de glucógeno puede ser debido al aumento de la tasa metabólica (glucogenólisis) para satisfacer las demandas de energía provocadas por el estrés de la exposición al tóxico; mientras que el decremento en el contenido proteínico es probablemente debido a una intensiva proteólisis causada por el Zn. Por último, la disminución en el contenido de lípidos puede ser explicada por la citotoxicidad del Zn el cual causa daño a la membrana celular.

Como se comentó anteriormente, es importante definir los niveles de toxicidad de los metales para la producción y el cultivo de una especie de gran importancia económica y social para nuestro país, para poderlos comparar con los valores encontrados en cuerpos de agua naturales. Por ejemplo, Ramírez *et al.* (1989) obtuvieron valores para Pb, Cr y Cd de 246.4, 50.6 y 35  $\mu\text{g/L}$ , respectivamente, en la laguna de Tamiahua, Veracruz. Villanueva y Botello (1998) al revisar los valores de concentración de metales pesados en el agua de diversos ambientes costeros del Golfo de México encontraron para Hg, Pb, Cd, Cu y Zn valores de 3-63  $\mu\text{g/L}$ , 0.7-29.4, 0.9-3.1, 2.5 y 15  $\text{mg/L}$ .

Estos datos revelan que diferentes cuerpos acuáticos de la costa atlántica mexicana están seriamente impactados por los metales y un censo de la fauna de esos cuerpos revelaría el efecto de dichas concentraciones, cuyos valores sobrepasan los niveles de toxicidad que se encontraron en el presente estudio.

En la zona costera del Noroeste de México se cuenta con mucho menos actividad industrial que su contraparte del Golfo de México, y además existe una carencia de datos que informen sobre el nivel de concentración de los metales pesados en sus aguas naturales. Por otro lado, Astorga-Castro (en prep.) presenta los siguientes intervalos de valores en aguas de uso y de descarga de cinco granjas camaronícolas para Cd, Cu, Fe, Mn, Pb y Zn: 0.17-0.74, 0.19-2.24, 0.23-30.9, 0.61-74.2, 1.47-7.88 y 1.56-55.87  $\mu\text{g/L}$ , respectivamente. De estos seis elementos el Zn supera (55.87  $\mu\text{g/L}$ ) el nivel de toxicidad obtenido en el presente estudio (20.7  $\mu\text{g/L}$ ).

Es importante comentar que un experimento en laboratorio no puede duplicar las variables multifuncionales encontradas en situaciones naturales (Martin *et al.*, 1981); sin embargo, los experimentos de laboratorio son un complemento necesario de los datos del campo para obtener información sobre el modo de acción de los metales (Rainbow *et al.*, 1990).

Además, esta información puede ser utilizada para predecir, por lo menos como primera aproximación, el efecto de los diferentes niveles de los metales, lo cual resulta de gran importancia para determinar la máxima concentración que puede ser tolerada en los laboratorios de producción de postlarvas y estanques de cultivo sin ningún efecto deletéreo sobre la salud de los peneidos (Alcaraz *et al.*, 1999).

#### **6.4 Consumo de alimento**

Las pruebas de toxicidad aguda tienen como finalidad primaria la de establecer los límites de la concentración de cualquier tóxico que puede ser tolerada por diferentes especies en el medio en que habitan, por lo cual se centran exclusivamente en observar la mortalidad de los organismos de interés durante un tiempo determinado.

Por otro lado, según Buikema *et al.* (1982) y Rao y Sarma (1986) es importante corroborar los resultados de estas pruebas mediante observaciones adicionales, como por ejemplo las respuestas en condiciones subletales sobre el crecimiento, el comportamiento, el metabolismo medido en términos de actividades enzimáticas, además del consumo de alimento que, según Wong *et al.* (1993), es un buen indicador de estrés ambiental.

##### **6.4.1 Pruebas de toxicidad individuales**

Woo *et al.* (1993) observaron una disminución significativa en el consumo de alimento en decápodos cuando son expuestos al Cd. Este mismo fenómeno fue observado en el presente estudio, donde las postlarvas expuestas a 1 mg/L de cadmio total, tuvieron un consumo de alimento inferior al de los testigos. Dicho fenómeno fue observado por Rosenberg y Costlow (1976) en el cangrejo *Callinectes sapidus* expuesto a 50 µg/L de Cd. De acuerdo con Sarma (1993), los mecanismos de ataque y digestión de la presa pueden ser alterados

cuando los organismos son expuestos a tóxicos; esto puede provocar una disminución en el consumo de alimentos y un consiguiente menor crecimiento de los organismos.

Con respecto al Cu, la alta reducción del consumo de alimento observado en el presente estudio, fue también observada por Weeks (1993) quien, al someter al anfípodo *Orchestia gammarellus* a 0.817 mg/L de Cu, observó una reducción en su tasa de alimentación del 77.2 y 66.1% a 48 y 96 h, respectivamente. Wong *et al.* (1993) y Chen y Lin (2001) en postlarvas de *Metapenaeus ensis* y juveniles de *Penaeus monodon*, respectivamente, también observaron que la cantidad de alimento consumido decrecía conforme se incrementaba la concentración de Cu en el medio, fenómeno que también fue observado por Hubschman (1967) y White y Rainbow (1982) en los decápodos *Orconectes rusticus* y *Palaemon elegans*, en el orden.

En estas pruebas en particular, la alta incidencia de mudas observadas en las postlarvas expuestas a bajas concentraciones de Cu total, puede explicar el bajo consumo de alimento por las postlarvas de *L. vannamei* que se observó para esas concentraciones.

En el caso de las postlarvas expuestas al Zn, el estrés también ocasionó una reducción en el consumo de alimento, lo cual es observado de mejor manera en aquellas postlarvas expuestas a 1 y 1.5 mg/L. Este comportamiento también fue observado por Weeks (1993) al someter al anfípodo *Orchestia gammarellus* a 0.458 mg/L de Zn; observó una reducción en su tasa de alimentación del 67.4 al 50% a 48 y 96 h, respectivamente

En concordancia con la aseveración de Rao y Sarma (1986), a altas concentraciones del tóxico la captura de alimento decrece porque se afecta su comportamiento depredador y de acuerdo con Gilbert y Stemberger (1985), este consumo reducido de alimento que se observó en las postlarvas de *Litopenaeus vannamei* al ser expuestas a diferentes metales, pudo no ser suficiente para compensar sus costos metabólicos.

#### 6.4.2 Pruebas de toxicidad con mezclas

En estos ensayos, la cantidad de alimento suministrado se ajustó para mantener una ración constante, calculada con base en los organismos sobrevivientes registrados diariamente, sin el correspondiente ajuste de volumen de solución de prueba en el recipiente, para mantener constante la concentración de las presas.

Aunque esto pudiera haber resultado en una disminución de la captura de nauplios, debido a su menor concentración y a una consiguiente menor probabilidad de encuentro entre presa y depredador, este efecto se hubiera hecho notorio solo en los casos en los cuales se encontraron altas mortalidades asociadas a una disminución en el consumo de nauplios que, como se hizo notar, se encontró solamente en algunas oportunidades, mientras que en otras, el consumo global no se alejó en promedio del 85 %.

Se ha mencionado que las pruebas de toxicidad aguda deberían ser consideradas con cautela debido a que su utilidad consiste en verificar las dosis letales de los tóxicos objeto de estudio y de la posibilidad que tiene una población determinada de sobrevivir a un evento agudo de toxicidad. Los resultados también pueden ser utilizados para obtener el nivel de toxicidad de estos elementos, y con base en ello monitorear el nivel de concentración de dichos metales, siempre que no existan factores de estrés adicionales que puedan modificar de alguna manera la respuesta del organismo de prueba (Buikema *et al.*, 1982).

Para esto es necesario estudiar posibles efectos subletales, entre los cuales se ha sugerido la observación de eventuales modificaciones de los hábitos alimenticios del organismo de prueba (Rao y Sarma, 1986; Wong *et al.*, 1993).

Aparentemente, esto no es aconsejable en el caso *L. vannamei* cuando se usan solamente los resultados de pruebas a corto plazo: en varios de los experimentos de las mezclas de dos metales se verificó un consumo de alimento cercano al 100 % comparado con los testigos durante siete días, aun con dosis muy cercanas a la necesaria para causar un 50 % de mortalidad. Evidentemente, en todos los casos no es solo el consumo de alimento el efecto

que debería de estudiarse, sino otros aspectos como su asimilación, ya que, con pocas excepciones, los factores de estrés que son el objeto de este trabajo no causaron cambios importantes en el comportamiento alimenticio de este organismo depredador.

### 7.- CONCLUSIONES

1. Las  $CL_{50-96}$  h para postlarvas de *Litopenaeus vannamei* fueron de 2.49, 37.3, 44.3, 130, 1.23, 134 y 2.1 mg/L. para Cd, Cu, Fe, Mn, Hg, Pb y Zn, respectivamente.
2. El orden de toxicidad de los siete metales estudiados en postlarvas de *L. vannamei* fue Hg>Zn>Cd>Cu>Fe>Mn>Pb.
3. Con respecto a las mezclas (RT= 1:1) la  $UT_{50-168}$  h para Cd-Hg, Cd-Zn, Zn-Hg, Hg-Pb, Cu-Zn y Fe-Mn fueron de 0.19, 2.12, 0.14, 0.20, 1.44 y 1.43 unidades, respectivamente.
4. La suma de contribuciones tóxicas (S) del efecto de la interacción Cd-Hg, Zn-Hg y Hg-Pb fue sinérgica, mientras que para Cd-Zn, Cu-Zn y Fe-Mn fue antagónica. En ninguna de las mezclas probadas se observó el efecto de aditividad estricta.
5. Tanto en los experimentos individuales como en las mezclas, no se evidenció una tendencia definida y general con respecto al estadio de ecdysis. Sin embargo, en los experimentos con Cu, el número de exuvias observadas fue mayor que en cualquier otro tratamiento.
6. En contraste con lo anterior, el Cu disminuyó seriamente el consumo de alimento, independientemente de su concentración. Un efecto similar se observó en el caso del Hg. En general se puede concluir que no existen evidencias suficientes para afirmar que el consumo de alimento sea un parámetro de utilidad para verificar la presencia de factores subletales de estrés en las postlarvas de *L. vannamei*.
7. La máxima concentración de Cd, Cu, Fe, Mn, Hg, Pb y Zn para aguas de uso en laboratorios de producción de postlarvas de camarón que usen agua de mar, debe de ser 24.9, 373, 443, 1300, 12.3, 1340 y 20.8  $\mu\text{g/L}$ , respectivamente, los cuales se calcularon utilizando un factor de aplicación de 0.01, que fue el único en el cual no se observaron efectos letales y con crecimiento similar al de los testigos.



## 8. LITERATURA CITADA

- Abdel-Moati, A. y Farag E. (1991). Toxicity and bioaccumulation studies of Cu, Zn and Pb in the freshwater gastropods, *Lanistes bolteni* Chemnitz 1786 (Gastropoda: Ampullaridae). J. Egyptian Germany Soc. Zool., 4: 289-299.
- Ahsanullah, M. y Arnott G.H. (1978). Acute toxicity of copper, cadmium and zinc to larvae of the crab *Paragrapsus quadridentatus* (H. Milne Edwards), and implications for water quality criteria. Aust. J. Mar. Freshwat. Res., 29: 1-8.
- Ahsanullah, M., Negilski D.S. y Mobley M.C. (1981). Toxicity of zinc, cadmium and copper to the shrimp *Callinassa australiensis*. I. Effects of individual metals. Mar. Biol., 64: 299-304.
- Ahsanullah, M. y Ying W. (1995). Toxic effects of dissolved copper on *Penaeus merguensis* and *Penaeus monodon*. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 55:81-88.
- Aisen, P. y Listowsky I. (1980). Iron transport and storage proteins. Ann. Rev. Biochem., 49: 357-393.
- Alcaraz, G., Chiappa-carrara X., Espinoza V. y Vanegas C. (1999). Acute toxicity of ammonia and nitrite to white shrimp *Penaeus setiferus* postlarvae. J. World Aquaculture Soc., 31: 90-97.
- Allan, G.L., Maguirre G.B. y Hopkins S.J. (1990). Acute and chronic toxicity of ammonia to juvenile of *Metapenaeus macleayi* and *Penaeus monodon* and the influence of low dissolved oxygen levels. Aquaculture, 91: 265-280.
- Ananthalakshmikumari, K.V.V., Shyamasubdari K. y Rao K.H. (1990). Toxicity to freshwater male and female field crabs, *Paratelphusa hydrodromous* (Herbst) (Decapoda:Brachyura). Bull. Environ. Contam. Toxicol., 45: 900-906.
- APHA-AWWA-WPCF, (1989). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. American Public Health Association, American Water Works Association and Water Pollution Control Federation. 17<sup>th</sup> ed. Washington D.C.
- APHA-AWWA-WPCF, (1992). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. American Public Health Association, American Water Works Association and Water Pollution Control Federation. 18<sup>th</sup> ed. Washington D.C.
- Aoki, Y., Hatakeyana S., Kobayashi N., Sumi Y., Suzuki T. y Suzuki K.T. (1989). Comparison of cadmium-binding protein induction among mayfly larvae of heavy

- metal resistant (*Bactis thermicus*) and susceptible species (*B. yushinensis* and *B. sahuensis*). *Comp. Biochem. Physiol.*, 93C: 345-357.
- Astorga-Castro, J.O. (en prep.). Determinación de pH, materia orgánica y carbonatos en sedimento y metales pesados en agua de cinco granjas camaronícolas del norte del estado de Sinaloa. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias del Mar. Universidad Autónoma de Sinaloa.
- Baden, S.P. y Neil D.M. (1998). Accumulation of manganese in the haemolymph, nerve and muscle tissue of *Nephrops norvegicus* (L.) and its effect on neuromuscular performance. *Comp. Biochem. Physiol.*, 119A: 351-360.
- Baden, S.P., Eriksson S.P. y Weeks J.M. (1995). Uptake, accumulation and regulation of manganese during experimental hypoxia and normoxia by the decapod *Nephrops norvegicus* (L.). *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 103: 65-72.
- Bahner, L.H. y Nimmo D.R. (1976). Methods to assess effects of combinations of toxicants, salinity and temperature on estuarine animals. Presented at the 9<sup>th</sup> Annual Conference on Trace Substances in the Environment Health. 10-12 June. Columbia, MO.
- Bakir, F., Damluji S.F., Amin-Zaki L., Murtadha M., Khalidi A., Al-Rawi N.Y., Tikriti S., Dhahir H.I., Clarkson T.W., Smith J.C. y Doherty R.A. (1973). Methylmercury poisoning in Iraq. An interuniversity report. *Science*, 181: 230-241.
- Bambang, Y., Thuet P., Charmantier-Daures M., Trilles J.P. y Charmantier G. (1994). Effect of copper on survival and osmoregulation of various developmental stages of the shrimp *Penaeus japonicus* Bate (Crustacea, Decapod). *Aquat. Toxicol.*, 33:125-139.
- Barnes, R.D. (1989). *Zoología de los Invertebrados*. Nueva Editorial Interamericana, McGraw Hill, México D.F., 957 pp.
- Bartholomew, G.A. (1964). The roles of physiology and behavior in the maintenance of homeostasis in the desert environment. *Cit. Pos. Sprague* (1971). *Water Res.*, 5: 245-266.
- Bianchini, A. y Gilles R. (1996). Toxicity and accumulation of mercury in three species of crabs, with different osmoregulatory capacities. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 57: 91-98.

- Bianchini, A. y Carvalho de Castillo P. (1999). Effects of zinc exposure on oxygen consumption and gill  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851 (Decapoda-Grapsidae). Bull. Environ. Contam. Toxicol., 62: 63-69.
- Bjerregaard, P. (1988). Interaction between selenium and cadmium in the hemolymph of the shore crab *Carcinus maenas*. Aquatic. Toxicol., 13: 1-11.
- Bjerregaard, P. y Vislie T. (1985). Effects of cadmium on hemolymph composition in the shore crab *Carcinus maenas*. J. Ecol. Physiol. Ser., 27: 135-146.
- Bodar, C. N.M., Voogt, P.A. y Zanden, D.I. (1990). Ecdysteroids in *Daphnia magna*: their role in molting and reproduction and their levels upon exposure to cadmium. Aquat. Toxicol., 17: 339-350.
- Borgmann, U. y Ralph K.M. (1983). Complexation and toxicity of copper and the free metal bioassay technique. Water Res., 17: 1697-1703.
- Bottke, N. (1985). Electrophoretic and immunologic studies on the structure of a mollusc ferritin. Comp. Biochem. Physiol., 81B: 325-334.
- Botton, M.L., Johnson K. y Helleby L. (1998). Effect of copper and zinc on embryos and larvae of the horse crab *Limulus polyphemus*. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 35: 25-32.
- Bowen, H.J.M. (1966). The functions of the essential elements. Trace Metal in Biochemistry, Omega, España:102-133
- Brouwer, M., Winge D.R. y Gray W.R. (1989). Structural and functional diversity of copper-metallothioneins from the American lobster *Homarus americanus*. J. Biochem., 35: 289-303.
- Bruland, K.W. (1983). Trace elements in seawater. En: J.P. Riley y R. Chester (Eds.) Chemical Oceanography. Academic Press, New York: 157-220.
- Bruland, K.W., Franks R.P., Knauer G.A. y Martin J.H. (1979). Sampling and analytical methods for the determination of copper, cadmium, zinc and nickel at the nanogram per liter level in seawater. Anal. Chim. Acta, 105: 233-245.
- Brumbaugh, W.G., Ingersoll C.G., Kemble N.E., May T.W. y Zajicek J.L. (1994). Chemical characterization of sediments and pore water from upper Clark Fork river and Milltown reservoir, Montana. Environ. Toxicol. Chem., 13: 1971-1983.

- Bryan, G.W. (1967). Zinc concentrations of fast and slow contracting muscles in the lobster. *Nature*, 213: 1043-1053.
- Bryan, G.W. (1976). Heavy metals contamination in the sea. En: R. Johnston (Ed.) *Marine Pollution*, Academic Press, London, 302pp.
- Bryant, V., Newbery D. M., McLusky D. S. y Campbell R. (1985). Effect of temperature and salinity on the toxicity of nickel and zinc of two estuarine invertebrates (*Corophium volutator*, *Macoma balthica*). *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 24: 139-153.
- Buikema, A.L., Niederlehner B.R. y Cairns J. Jr. (1982). Biological monitoring. Part IV-Toxicity treating. *Water Res.*, 16: 239-262.
- Burton, D.I. y Fisher D.J. (1990). Acute toxicity of Cd, Cu, Zn, ammonia, 3,3 dichlorobenzidine, 2,6 dichloro-4-nitroaniline, methylene chlorine and 2,4,6-trichlorophenol to juveniles grass shrimp and killifish. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 44: 776-783.
- Byrne, R.H., Kump L.R. y Cantrell K.J. (1988). The influence of temperature and pH on trace metal speciation in seawater. *Mar. Chem.*, 25: 163-181.
- Cairns, Jr. J. y Pratt J.R. (1989). The scientific basis of bioassays. *Hidrobiologia*, 188/189: 5-20.
- Calabrese, E.J. y Baldwin L.A. (1998). Hormesis as a biological hypothesis. *Environ. Health Persp.*, 106: 357-362.
- Campbell, P.G.C. y Tessier A. (1991). Biological availability of metals in sediments: analytical approaches. En: J.P. Vernet (Ed.) *Heavy Metals in the Environment*. Elsevier, London, 405 pp.
- Canfield, D.E., Jorgensen B.B., Fossing H., Glud R., Gundersen J., Ramsing N.B., Thamdrup B., Hansen J.W., Nielsen L.P. y Hall P.O.J. (1993). Pathways of organic carbon oxidation in three continental margin sediments. *Mar. Geol.*, 113: 27-40.
- Canli, M. y Furness R.W. (1993). Toxicity of heavy metals dissolved in sea water and influences of sex and size on metals accumulation and tissue distribution in the Norway lobster *Nephrops norvegicus*. *Mar. Environ. Res.*, 36: 217-236.
- Cañizares-Villanueva, R.O., Martínez-Cordova F. y Espinosa-Chávez F. (2000). Acute toxicity to *Daphnia magna* of effluents containing Cd, Zn and a mixture of Cd-Zn, after metal removal by *Chlorella vulgaris*. *Environ. Toxicol.*, 15: 160-164.

- Carignan, R. y Tessier A. (1985). Citado por: Campbell y Tessier (1991). Biological availability of metals in sediments: analytical approaches. En: J.P. Vernet (Ed.) Heavy Metals in the Environment. Elsevier, London, 405 pp.
- Carpene, E. (1993). Metallothionein in marine molluscs. En: R. Dallinger y P.S. Rainbow (Eds.) Ecotoxicology of Metals in Invertebrates. Lewis Publishers, London, 461pp.
- Carvalho, F.P., González-Farías F., Mee L.D. y Fowler S.W. (1994). The impact of pesticides in coastal lagoons and implications for management of the coastal zone in Mexico. Proc. Int. Water Seminar. Mazatlán 1994, Comisión Nacional del Agua. European Union and Instituto Mexicano de Tecnología del Agua. Mexico.
- Chang, L.W. y Cockerham L. (1994). Toxic metals in the environment. En: L.G. Cockerham y B.S. Shane (Eds.) Basic Environmental Toxicology. CRC Press, Boca Raton, 627 pp.
- Chen, J.C. y Chin T.S. (1988). Joint action of ammonia and nitrite on tiger prawn *Penaeus monodon* postlarvae. J. World Aquac. Soc., 19: 143-148.
- Chen, J.C. y Chin T.S. (1989). Effect of ammonia at different pH levels on *Penaeus monodon* postlarvae. Asian Fish. Sci., 2: 233-238.
- Chen, J.C. y Lin C. H. (2001). Toxicity of copper sulfate for survival, growth, molting and feeding of juveniles of the tiger shrimp, *Penaeus monodon*. Aquaculture, 192: 55-65.
- Chen, J.C., Ting Y.Y. y Lin M.N. (1990). Lethal effects of ammonia and nitrite on *Penaeus chinensis* juveniles. Mar. Biol., 107: 427-431.
- Chin, T.S. y Chen J.C. (1987). Acute toxicity of ammonia to larvae of the tiger prawn *Penaeus monodon*. Aquaculture, 66: 247-253.
- Chinni, S., Khan R.N. y Yallapragada P.R. (2000). Oxygen consumption, ammonia-N excretion, and metal accumulation in *Penaeus indicus* postlarvae exposed to lead. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 64: 144-151.
- Connor, P.M. (1972). Acute toxicity of heavy metals to some marine larvae. Mar. Pollut. Bull., 3: 190-192.
- Correa, M. (1986). Physiological effects of metal toxicity on the tropical freshwater shrimp *Macrobrachium carcinus* (Linneo, 1758). Environ. Pollut., 45: 149-155.
- Crespo, S. (1984). An *In vitro* study of the effects of zinc on osmoregulatory processes. Mar. Pollut. Bull., 15: 341-342.

- Culberson, C., Pytkowicz R.M. y Hawley J.E. (1969). Seawater alkalinity determination by the pH method. *J. Mar. Res.*, 3: 156-161.
- Dall, W., Hill B.J., Rothlisberg P.C. y Sharples D.J. (1990). Molting and growth. En: J.H.S. Blaxter y A.J. Southward (Eds.) *The Biology of Penaeidae*, Vol. 27, Academic Press, London, 489 pp.
- Daly, H.R., Hart B.T. y Campbell I.C. (1992). Short communication. Copper toxicity to *Parapatya australiensis*, IV. Relation with ecdysis. *Environ. Toxicol. Chem.*, 11: 881-883.
- De Conto Cinier, C., Petit-Romel M., Faure R. y Bortolato M. (1998). Cadmium accumulation and metallothionein biosynthesis in *Cyprinus carpio* tissues. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 61: 793-799.
- De la Lanza, Espino, G. (1994). Química de las lagunas costeras y el litoral mexicano. En: G. De la Lanza-Espino y C. Cáceres-Martínez (Eds.) *Lagunas Costeras y el Litoral Mexicano*, Univ. Autón. Baja California Sur, 525 pp.
- D'Itri, F.M. (1972). *The Environmental Mercury Problem*. CRC Press, Cleveland Ohio.
- Duodoroff, P. (1952). Some recent developments in the study of toxic industrial wastes. *Proc. Fourth Pacific Northwest Industrial Waste Conf.* Washington: 1-21.
- Eisler, R. (1973). Annotated bibliography on biological effects of metals in aquatic environments. U.S. EPA Ecological Research Series. U.S. Government Printing Office, Washington, D.C.
- Eisler, R. (1981). *Trace Metal Concentrations in Marine Organisms*. Pergamon Press, Oxford. 685pp.
- Eisler, R. y Hennekey R. J. (1977). Acute toxicities of Cd, Cr, Hg, Ni, and Zn to estuarine macrofauna. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 6: 315-323.
- Engel, D.W. (1987). Metal regulation and molting in the blue crab *Callinectes sapidus*: copper, zinc and metallothionein. *Biol. Bull.*, 172: 69-82.
- Engel, D.W. y Brouwer M. (1987). Metal regulation and molting in the blue crab *Callinectes sapidus*: metallothionein function in metal metabolism. *Biol. Bull.*, 173: 239-251.
- Enserink, E. L., Maas-Diepeveen J.L. y Van Leeuwen C.J. (1991). Combined effects of metals: an ecotoxicological evaluation. *Wat. Res.*, 25:679-687.

- EPA, (1979). The water of Westernport bay and catchment. U.S. Environmental Protection Agency. Government Printer, Melbourne, Australia.
- EPA, (1985). Ambient Water Quality Criteria for Cadmium. U.S. Environmental Protection Agency. Washington DC, USA.
- EPA, (1991). Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms. C.I. Weber (Ed.) EPA/600/4-90/027, US EPA, Cincinnati, OH, USA.
- Eriksson, S.P. (1998). Marine animal-sediments interactions: Effects of hypoxia and manganese on the benthic crustacean, *Nephrops norvegicus* (L.). Citado por: Eriksson (2000). Aquatic Toxicol., 48: 297-307.
- Eriksson, S.P. (2000). Temporal variations of manganese in the haemolymph and tissues of the Norway lobster, *Nephrops norvegicus* (L.). Aquatic Toxicol., 48: 297-307.
- Espina, S. y Vanegas C. (1996). Ecotoxicología y contaminación. En: A.V. Botello, J.L. Rojas-Galaviz, J.A. Benitez y D. Zarate-Lomeli (Eds.) Golfo de México, Contaminación e Impacto Ambiental: Diagnósticos y Tendencias. Univ. Autón. Campeche. EPOMEX 5, 666 pp.
- Fingerman, M., Devi M., Reddy P.S. y Katyayani R. (1996). Impact of heavy metal exposure on the nervous system and endocrine-mediated processes in crustaceans. Zool. Stud., 35: 1-8.
- Finney, D.J. (1971). Probit Analysis. 3er ed. Cambridge University Press. London.
- Fletcher, P.E. y Fletcher G.L. (1980). Zinc-and copper-binding proteins in the plasma of winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*). Can. J. Zool., 58: 609-621.
- Forstner, U. y Wittman G.T. (1981). Metal pollution in the aquatic environment. Springer-Verlang, New York.
- Frias-Espéricueta, M.G., Harfush-Melendez M.R., Osuna-López J.I. y Páez-Osuna F. (1999). Acute toxicity of ammonia to juvenile shrimp *Penaeus vannamei* Boone. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 62: 646-652.
- Frias-Espéricueta, M.G., Harfush-Melendez M.R. y Páez-Osuna F. (2000). Effects of Ammonia on mortality and feeding of postlarvae shrimp *Penaeus vannamei*. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 65:98-103.

- Frías-Espericueta, D. Voltolina, J.I. Osuna-López (2001). Acute toxicity of Cd, Hg and Pb to whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* postlarvae. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 67:580-586.
- Gentile, S.M. (1982). Heavy metal toxicity. US Environmental Protection Agency, Narragansett, RI, USA.
- Gilbert, J.J. y Stemberger R.S. (1985). Prey capture in the rotifer *Asplanchna girodi*. Verh. Int. Ver. Limnol., 22: 2997-3000.
- González-Farias, F., Carvalho F.P., Fowler S.W. y Mee L.D. (1996). A tropical coastal lagoon affected by agricultural activities. Proceedings of International Symposium on the Use of Nuclear and Related Techniques for Studying Environmental Behavior of Crop Protection Chemicals. IAEA-FAO, Viena, Italia.
- Green, F.A., Anderson J.W., Petrocelly S.R., Presley B.J. y Sims R. (1976). Mar. Biol., 37:75.
- Greenwood, J.G. y Fielder D. R. (1983). Acute toxicity of zinc and cadmium to zoeae of three species of portunid crabs (Crustacea: Brachyura). Comp. Biochem. Physiol., 75C: 141-144.
- Hagino, N. y Yoshioka K. (1961). A study on the cause of "Itai-Itai" disease. J. Jpn. Orthop. Assoc., 35: 812-825.
- Hall, Jr. L.W., Ziegenfuss M.C., Anderson R.D. y Lewis B.L. (1995). The effect of salinity on the acute toxicity of total and free cadmium to a Chesapeake bay copepod and fish. Mar. Pollut. Bull., 30: 376-384.
- Hansen, J.I., Mustafa T. y Depledge M. (1992). Mechanisms of copper toxicity in the shore crab *Carcinus maenas*. I. Effects on Na-K-ATPase activity, haemolymph electrolyte concentration and tissue water contents. Mar. Biol., 114: 253-257.
- Harris, E.D (1991) Copper transport: an overview. Prac. Soc. Expr. Med., 192: 130-140.
- Hartung, R. (1973). Biological effects of heavy metals pollutants in water. En: S.K. Dhar (Ed.) Metal Ions in Biological Systems. Plenum Press, NY, 256 pp.
- Haya, K., Waiwood B.A y Johnston D.W. (1983). Adenylate energy charge and ATPase activity of lobster (*Homarus americanus*) during sub-lethal exposure to zinc. Aquat. Toxicol., 3: 115-126.



- Hebel, D.K., Jones M.B. y Depledge (1997). Responses of crustaceans to contaminant exposure: a holistic approach. *Estuar. Coastal Shelf Sci.*, 44: 177-184.
- Hubert, J.J. (1992). *Bioassay*. Kendall/Hunt Publishing Company, Iowa, 198pp.
- Hubschman, J.H. (1967). Effects of copper on the crayfish *Orconectes rusticus* (Girard). *Crustaceana*, 12: 33-42.
- Hughes, G.M. (1976). Polluted fish physiology. En: L. Lockwood (Ed.) *Effects of Pollutants on Aquatic Organisms*. Cambridge University Press, Cambridge. 441 pp.
- Jain, S.K., Raizada A.K., Shrivastava S. y Jain K. (1996). Protective action of zeolite on lead toxicity in fresh water fish. *Environ. Bull.*, 5: 466-468.
- Jansen, M. y Groman D. (1993). The effect of high concentrations of iron on impounded American lobsters: A case of study. *J. Aquatic Animal Health*, 5: 155-156.
- Jennings, J.R. y Rainbow P.S. (1979). Studies on the uptake of cadmium by the crab *Carcinus maenas* in the laboratory. Accumulation from sea water and food source. *Mar. Biol.*, 50: 131-140.
- Johns, T.M. y Miller D.C. (1982). The use of bioenergetics to investigate the mechanics of pollutant toxicity in crustaceans larvae. En: W.B. Vernberg, A. Calabrese, F.P.
- Johnson, M.W. y Gentile J.H. (1979). Acute toxicity of cadmium, copper, and mercury to larval American lobster *Homarus americanus*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 22: 258-264.
- Jones, M. B. (1975). Synergistic effects of salinity, temperature and heavy metals on mortality and osmoregulation in marine and estuarine isopods (Crustacea). *Mar. Biol.*, 30: 13-20.
- Keteles, K.A. y Fleeger J.W. (2001). The contribution of ecdysis to the fate of copper, zinc and cadmium in grass shrimp, *Palaemonetes pugio* Holthius. *Mar. Pollut. Bull.*, 42: 1397-1402.
- Kim, K.S., Webb J. y Macey D. J. (1986). Properties and role of ferritin in the hemolymph of the chiton *Clavarizona hirotosa*. *Biochem. Biophys. Acta*, 884: 387-403.
- Kime, D.E. (1995). The effects of pollution on reproduction in fish. *Rev. Fish Biol.*, 5: 52-96.
- Kito, H., Ose Y. y Sato T. (1986). Cadmium-binding protein (metallothioneins) in carp. *Environ. Health Perspect*, 65: 117-124.

- Kraak, M.H.S. (1992). Ecotoxicity of metals to the freshwater mussel *Dreissena polymorpha*. Ph. D. Tesis. Universidad de Amsterdam, Holanda.
- Kraus, M. L. y Kraus D. B. (1986). Differences in the effects of mercury on predator avoidance in two populations of the grass shrimp *Palaemonetes pugio*. Mar. Environ. Res., 18: 277-289.
- Kraus, M.L., Weis J.S. y Weis P. (1988). Effects of mercury on larval and adult grass shrimp (*Palaemonetes pugio*). Arch. Environ. Contam. Toxicol., 17: 355-365.
- Krishnaja, A.P., Rege M.S. y Joshi A.G. (1987). Toxic effects of certain heavy metals (Hg, Cd, Pb, As and Se) on the intertidal crab *Scylla serrata*. Mar. Environ. Res., 21: 109-119.
- Landis, W. G. y Yu, M. H. (1999). Heavy metals. Environmental Toxicology. Impacts of chemicals upon ecological systems. Lewis Publishers, USA, 390pp.
- Lasier, P.J., Winger P.V. y Bogenrieder K.J. (2000). Toxicity of manganese to *Ceriodaphnia dubia* and *Hyalella azteca*. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 38: 298-304.
- Livett, E.A. (1988). Citado por: Campbell y Tessier (1991). Biological availability of metals in sediments: analytical approaches. En: J.P. Vernet (Ed.) Heavy Metals in the Environment. Elsevier, London, 405 pp.
- Lloyd, R. (1961). The toxicity of mixtures of zinc and copper sulphates to rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson). Ann. Applied Biol., 49: 535-538.
- Lobel, P.B., Belkhod S.P., Jackson S.E. y Longerich H.P. (1991) Sediment in the intestinal tract: A potentially serious source of error in aquatic, biological monitoring programs. Mar. Environ. Res., 31: 163-174.
- Lorenzon, S., Francese M. y Ferrero E.A. (2000). Heavy metal toxicity and differential effects on the hyperglycemic stress response in the shrimp *Palaemon elegans*. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 39: 167-176.
- Madsen, K.N. (1992). Effects of arsenic and survival and metabolism of *Crangon crangon*. Mar. Biol., 113: 37-44.
- Magwood, S. y George S. (1996). In vitro alternatives to whole animal testing, comparative cytotoxicity studies of divalent metals in established cell lines derived from tropical and temperate water fish species in a neutral red assay. Mar. Environ. Res., 42: 37-40.

- Malik, D.S., Sastry K.V. y Hamilton D.P. (1998). Effects of zinc toxicity on biochemical composition of muscle and liver of murrel (*Channa punctatus*). *Environ. Intl.*, 24: 433-438.
- Mance, G. (1987). Pollution threat of heavy metals in aquatic environments. Elsevier Applied Science. New York. 372 pp.
- Mantoura, R.F.C., Dickson A. y Riley J.P. (1978). The complexation of metals with humic materials in natural waters. *Estuar. Coastal Mar. Sci.*, 6: 378-408.
- Mariño-Balsa, J.C., Poza E., Vázquez E. y Beiras R. (2000). Comparative toxicity of dissolved metals to early larval stage of *Palemon elegans*, *Maja squinado*, and *Homarus gammarus* (Crustacea:Decapoda). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 39: 345-351.
- Marking, L.L. (1985). Toxicity of chemical mixtures. En: G.M. Rand y S.R. Petrocelli (Eds.). *Fundamentals of Aquatic Toxicology*. Hemisphere Publis., London: 164-176.
- Martin, M., Osborn K. E. Billig P. y Glickstein N. (1981). Toxicities of ten metals to *Crassostrea gigas* and *Mytilus edulis* embryos and *Cancer magister* larvae. *Mar. Pollut. Bull.*, 12: 305-308.
- Masuda, K. y Boyd C.E. (1993). Comparative evaluation of the solubility and toxicity of copper sulfate and chelated copper. *Aquaculture*, 117: 287-302.
- McCloskey, J.T., Newman M.C. y Clark S.B. (1996). Predicting the relative toxicity of metal ions using ion characteristics: Microtox( bioluminescence assay. *Environ. Toxicol. Chem.*, 15: 1730-1737.
- McLeese, D.W. (1974). Toxicity of copper at two temperatures and three salinities to the American lobster (*Homarus americanus*). *J. Fish. Res. Board Can.*, 31: 1949-1952.
- McLusky, D.S. y Hagerman L. (1987). The toxicity of chromium, nickel and zinc: effects of salinity and temperature, and the osmoregulatory consequences in the mysid *Praunus flexuosus*. *Aquatic Toxicol.*, 10: 225-238.
- McLusky, D.S., Bryant V. y Campbell R. (1986). The effects of temperature and salinity on the toxicity of heavy metals to marine and estuarine invertebrates. *Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev.*, 24: 481-520.

- Mee, L.D., Readman J.W., Carranza J. y González-Farías F. (1991). Fate of agrochemicals in tropical coastal lagoon ecosystems. Consolidated Report of Activities 1986-1990, EEC-México EUR-13970, Bruselas: 113-117.
- Miller, J.C. y Miller J.N. (1987). Statistics for analytical chemistry. Jonh Wiley & Sons, New York, 227pp.
- Millero, F. (1996). Chemical Oceanography. CRC Press, Boca Raton, 469pp.
- Mohan, C.V., Gupta T.R.C., Shelly H.P.C. y Menon M. (1986). Combined toxicity of mercury and cadmium to the tropical green mussel *Perna viridis*. Dis. Aquat. Org., 2: 65-72.
- Naqvy, S.M. y Howell R.D. (1993). Toxicity of cadmium and lead to juvenile red swamp, *Procambarus clarkii*, and effects on fecundity of adults. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 51: 303-308.
- Naqvi, S.M., Devalraju I. y Naqvi N.H. (1998). Copper bioaccumulation and depuration by red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 61:65-71.
- Negilski, D.S., Ahsanullah M. y Mobley M.C. (1981). Toxicity of zinc, cadmium and copper to the shrimp *Callinassa australiensis*. II. Effects of paired and triad combinations of metals. Mar. Biol., 64:305-309.
- Nimmo, D.R., Lighter D.V. y Bahner L.H. (1977) Effects of cadmium on the shrimps *Pennies duorarum*, *Palaemonetes pugio*, *Palaemonetes vulgaris*. En: W.B. Vernberg, A.C. Calabrese, F.P. Thurberg y F.J. Vernberg (Eds.) Physiological Responses of Marine Biota to Pollutants, Academic Press, NY, 183 pp.
- Ortiz, J.B., Gonzalez de Canales M.L. y Sarasquete C. (1999). Quantification and histopathological alterations produced by sublethal concentrations of copper in *Fundulus heteroclitus*. Ciencias Marinas, 25: 119-143.
- Osuna-López J.I., Páez-Osuna F., Marmolejo-Rivas C. y Ortega-Romero P. (1989). Metales pesados disueltos y particulados en el puerto de Mazatlán. An. Inst. Ciencias del Mar y Limnol., 16: 307-320.
- Osuna-López J.I., Zazueta-Padilla H.M., López-López G., Frías-Espéricueta M.G. y Izaguirre-Fierro F. (1998). Plaguicidas organoclorados y bifenilos policlorinados en organismos bioindicadores de contaminación en el Pacífico subtropical mexicano.

- En: Biomonitorio de la contaminación en las aguas costeras del Pacífico Subtropical Mexicano: Metales pesados, Plaguicidas e Hidrocarburos del petróleo. Informe Anual. Proyecto CONACYT 0185P-T.
- Páez-Osuna, F. (1996). Efectos de los metales. En: A.V. Botello, J.L. Rojas-Galaviz, J.A. Benitez y D. Zarate-Lomelí (Eds.) Golfo de México, Contaminación e Impacto Ambiental: Diagnósticos y Tendencias. Univ. Autón. Campeche. EPOMEX 5, 666 pp.
- Paéz-Osuna, F. y Frías-Espericueta M.G. (2001). Bioacumulación, Distribución y Efectos de los Metales Pesados en los Peneidos. En: F. Páez-Osuna (Ed.) La Camaronicultura y el Medio Ambiente. Colegio de Ciencia de Sinaloa, Cap. 13, México D.F.: 245-270.
- Páez-Osuna, F. y Marmolejo-Rivas C. (1990). Trace metals in tropical coastal lagoon bivalves, *Crassostrea corteziensis*. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 45: 538-544.
- Páez-Osuna, F., Osuna-López J.I., Izaguirre-Fierro G. y Zazueta-Padilla H.M. (1994). Trace metals in mussels from the Ensenada del Pabellón lagoon, Mexico. Mar. Pollut. Bull., 28: 124-126.
- Pedersen, F. y Petersen G.I. (1996). Variability of sensitivity to complex mixtures. Wat. Sci. Tech., 33: 109-119.
- Pequeux, A. (1995). Osmotic regulations in crustaceans. J. Crustacean Biol., 15: 1-60.
- Pequeux, A., Bianchini A. y Gilles R. (1995). Mercury and osmoregulation in the euryhaline crab *Eriocheir sinensis*. Comp. Biochem. Physiol., 113C: 149-155.
- Phillips, D.J.H. (1980). The toxicity and accumulation of cadmium to marine and coastal biota. En: J.O. Nriagu (Ed.), Cadmium in the Environment, Part 1. Ecological Cycling, Wiley-Interscience, NY, 483 pp.
- Phillips, D.J.H. y Rainbow P.S. (1993). Biomonitoring of Trace Aquatic Contaminants. Elsevier Applied Science, New York, 371 pp.
- Postel, U., Petrusch G., Riestenpatt S., Weihrauch D., Malykh J., Becker W. y Siebers D. (1998). Inhibition of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase and of active ion-transport functions in the gills of the shore crab *Carcinus maenas* induced by cadmium. Mar. Biol., 130: 407-416.
- Prosi, F. (1989). Factors controlling biological availability and toxic effects of lead in aquatic organisms. Sci. Total Environ., 79: 157-169.

- Rainbow, P.S. (1988). The significance of trace metal concentrations in decapod. En: N. Firehand y P.S. Rainbow (Eds.) Aspects of decapod Crustacean Biology. Symposia of Zoological Society of London. No. 59.
- Rainbow, P.S. (1993). The significance of trace metals concentrations in marine invertebrates. En: R. Dallinger y P.S. Rainbow (Eds.) Ecotoxicology of Metals in Invertebrates. Lewis Publishers, Boca Raton, 461 pp.
- Rainbow, P.S. (1995). Physiology, physicochemistry and metal uptake – a crustacean perspective. Mar. Pollut. Bull., 31: 55-59.
- Rainbow, P.S. (1997). Ecophysiology of trace metal uptake in crustaceans. Est. Coastal Shelf Sci., 44: 169-175
- Rainbow, P.S., Phillips D.J.H. y Depledge M.H. (1990). The significance of trace metal concentrations in marine invertebrates. Mar. Pollut. Bull., 21: 321-324.
- Rama Kumar, T. y Prasad M.N.V. (1999). Metal binding properties of ferritin in *Vigna mungo* (L.) Hepper (Block gram): possible role in heavy metal detoxification. Bull Environ Contam. Toxicol., 62: 502-507.
- Ramachandran, S., Patel T.R. y Colbo M.H. (1997). Effect of copper and cadmium on three malaysian tropical estuarine invertebrate larvae. Ecotoxicol. Environ. Saf., 36: 183-188.
- Ramírez, P., Barrera G. y Rosas C. (1989). Effects of chromium and cadmium upon respiration and survival of *Callinectes similis*. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 43: 850-857.
- Rand, M.G. (1980). Detection: Bioassay. En: T. Guthrie y R. Perry (Eds.). Introduction to Environmental Toxicology, Academic Press, New York, 403 pp.
- Rao, K.R., Conklin P.J. y Doughtic D.G. (1985). Physiological and histopathological evaluation of toxicity of hexavalent chromium to the grass shrimp *Palaemonetes pugio* Holthuis. En: F. J. Vernberg, F. P. Thurberg, A. Calabrese y W. B. Vernberg (Eds.) Marine Pollution and Physiology: Recent Advances. University of Carolina Press, USA.
- Rao, M.V. (1989) Toxic effects of methylmercury on spermatozoa in vitro. Experimentia, 45: 985-987.

- Rao, T.R. y Sarma S.S.S. (1986). Demographic parameters of *Brachionus patulus* Muller (Rotifera) exposed to sublethal DDT concentrations at low and high food levels. *Hydrobiologia*, 139: 193-200.
- Reddy, B.C. y Fingerman M. (1994). Effect of cadmium chloride on amylase activity in the red swamp crayfish *Procambarus clarkii*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 109C: 309-314.
- Reed, y Beatty (1980). Citado por Viarengo (1985) Biochemical effects of trace metals. *Mar. Pollut. Bull.*, 16: 153-158.
- Roesijadi, G. (1980). Influence of copper on the clam *Protothaca staminea*. Effects on gills and occurrence of copper-binding proteins. *Biol. Bull.*, 158: 233-247.
- Roesijadi, G. y Klerks P. (1989). A kinetic analysis of Cd-binding to metallothionein and other intracellular ligands in oyster gills. *J. Exp. Zool.*, 251: 1-10.
- Roesijadi, G. y Robinson E. E. (1994). Metal regulation in aquatic animals: mechanisms of uptake, accumulation and release. En: D.C. Malins y G.K. Ostrander (Eds.) *Aquatic Toxicology*. Lewis Publishers, London, 539 pp.
- Rosenberg R. y Costlow J.D. Jr. (1976). Synergistic effects of cadmium and salinity combined with constant and cycling temperatures on the larval development of two estuarine crab species. *Mar. Biol.*, 38:291-303.
- Sarma, S.S.S. (1993). Feeding responses of *Asplanchna brightwelli* (rotifera): laboratory and field studies. *Hydrobiologia*, 255/256: 275-282.
- Shane, B.S. (1994). Introduction to ecotoxicology. En: L.G. Cockerham y B.S. Shane (Eds.) *Basic Environmental Toxicology*. CRC Press: 3-10.
- Shealy, M.H. y Sandifer P.A. (1975). Effects of mercury on survival of the larval grass shrimp *Palaemonetes pugio*. *Mar. Biol.*, 33: 7-16.
- Silva, J.J. y Williams J.P. (1991). *The Biological Chemistry of the Elements. The Inorganic Chemistry of Life*, Clarendon Press, Oxford.
- Simkiss, K y Mason A.Z. (1983). Metal ions; metabolic and toxic effects. En: P.W. Hochachka (Ed.) *The Mollusca*. Vol 2, Academic Press, New York, 362 pp.
- Simpson, R. D. (1979). Uptake and loss of zinc and lead by mussel (*Mytilus edulis*) and relationship whit body weight and reproductive cycle. *Mar. Pollut. Bull.*, 10: 74-84.
- Singh, B.R. y Steinnes E. (1994). Soil and water contamination by heavy metals. En: R. Lal y B.A. Stewart (Eds.) *Soil processes and water quality*. Lewis Publishers, 398 pp.

- Sokal, R.R. y Rohlf F.J. (1979). *Biometría. Principios y Métodos Estadísticos en la Investigación Biológica*. H. Blume ediciones, Madrid, 832 pp.
- Solorzano, L. (1969). Determination of ammonia in natural waters by the phenol-hypochlorite method. *Limnol. Oceanogr.*, 14: 799-801.
- Spehar, R.L. y Fiandt J.T. (1986). Acute and chronic effects of water quality criteria-based metal mixtures on three aquatic species. *Environ. Toxicol. Chem.*, 5: 917-931.
- Spehar, R.L., Anderson R.L. y Fiandt J.T. (1978). Toxicity and bioaccumulation of cadmium and lead in aquatic invertebrates. *Environ. Pollut.*, 5: 195-208.
- Sprague, J.B. (1970). Measurement of pollutant toxicity to fish II. Utilizing an applying bioassay results. *Water Res.*, 4: 3-32.
- Sprague, J.B. (1971). Measurement of pollutant toxicity to fish III. Sublethal effects and "safe" concentrations. *Water Res.*, 5: 245-266.
- Sprague, J.B. y Ramsay B.A. (1965). Lethal levels of mixed copper-zinc solutions for juvenile salmon. *J. Fish. Res. Board Can.*, 22: 425-432.
- Stevenson, J.R. (1986). Dynamics of the integument. En: D.E. Bliss y L.H. Mantel (Eds.) *The Biology of Crustacea*. Academic Press, Orlando Fl:1-42.
- Stocker, H.S. y Seager S.L. (1981). Metales tóxicos. *Química Ambiental: Contaminación del Aire y del Agua*. Editorial Blume, España, 298 pp.
- Strickland, J.D.H. y Parsons T. (1972). A manual for seawater analysis. *Bull. Fish. Res. Can.*, 167 pp.
- Stromgren, T. (1980). Combined effects of Cu, Zn and Hg on the increase in length of *Ascophyllum nodosum* (L.). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 48: 225-231.
- Sullivan, J.K. (1977). Effects of salinity and temperature on the toxicity of cadmium to the estuarine crab *Paragrapsus gairmardii* (Milne Edwards). *Aust. J. Mar. Freshwat. Res.*, 28: 739-744.
- Sullivan, B.K., Buskey E., Miller O.C. y Ritacco P.J. (1983). Effects of copper and cadmium on growth, swimming and predator avoidance in *Eurytemora affinis* (Copepoda). *Mar. Biol.*, 77: 299-306.
- Sunda, W.G., Tester P.A. y Huntsman S.A. (1987). Effects of cupric and zinc ion activities on the survival and reproduction of marine copepods. *Mar. Biol.*, 94: 203-210.



- Tarzwel, C.M. (1971). Bioassays to determine allowable waste concentrations in the aquatic environment. I. Measurement of pollution effects on living organisms. Proceedings Royal Society, London. 279pp.
- Tatara, C.P., Newman M.C., McCloskey J.T. y Williams P.L. (1998). Use of ion characteristics to predict relative toxicity of mono-, di- and trivalent metal ions: *Caenorhabditis elegans* LC50. Aquatic Toxicol., 42: 255-269.
- Tessier, A., Carignan R., Cubreuil B. y Rapin F. (1989). Citados por: Campbell y Tessier (1991). Biological availability of metals in sediments: analytical approaches, En: J.P. Vernet (Ed.) Heavy Metals in the Environment. Elsevier, London, 405 pp.
- Thorp, V.J. y Lake P.S. (1974). Toxicity of cadmium on selected freshwater invertebrates and the interaction of cadmium and zinc on the freshwater shrimp, *Paratya tasmaniensis* Riek. Aust. J. Freshwat. Res., 25: 97-104.
- Thorpe, G.J. y Costlow J.D. (1989). The relation of the acute (96-h) uptake and subcellular distribution of cadmium and zinc to cadmium toxicity in larvae of *Rhithropanopeus harrisi* and *Palaemonetes pugio*. Aquatic Toxicol. Hazard Assess., 12: 82-94.
- Truchot, J.P. y Rtal A. (1998). Effects of long-term sublethal exposure to copper on subsequent uptake and distribution of metal in the shore crab *Carcinus maenas*. J. Crustacean Biol., 18: 224-231.
- Tulasi, S.J. y Ramana Rao J.V. (1989). Effects of organic and inorganic lead on the oxygen equilibrium curves of the fresh water field crab, *Barytelphusa guerini*. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 42: 247-253.
- Turner, D.R., Whitfield M. y Dickson A.G. (1981). The equilibrium speciation of dissolved components in freshwater and seawater at 25°C and 1 atm pressure. Geochim. Cosmochim. Acta, 45: 855-881.
- Uma-Devi, V. (1987). Heavy metals toxicity to fiddler crabs *Uca annulipes* Latreille and *Uca triangularis* (Milne Edwards): tolerance to copper, mercury, cadmium and zinc. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 39: 1020-1027.
- Uma-Devi, V. y Prabhakara-Rao Y. (1989) Heavy metals toxicity to fiddler crabs *Uca annulipes* Latreille and *Uca triangularis* (Milne Edwards): respiration on exposure to copper, mercury, cadmium and zinc. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 43: 165-172.

- Vanegas, C., Espina S., Botello A.V. y Villanueva S. (1997). Acute toxicity and synergism of cadmium and zinc in white shrimp, *Penaeus setiferus* juveniles. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 58: 87-92.
- Vermeulen, A. C. (1995). Elaborating chironomid deformities as bioindicators of toxic sediments stress: the potential application of mixture toxicity concepts. Ann. Zool. Fennier. 32: 265-285.
- Vernberg, W.B., Decoursey P.J. y O'Hara J. (1974). Multiple environmental factors effects on physiology and behavior of the fiddler crab *Uca pugilator*. En: W.B. Vernberg y F.J. Vernberg (Eds.) Pollution and Physiology of Marine Organisms. Academic Press, New York, 425 pp.
- Verboost, P.M. van Rooij J., Flik G., Lock R.A.C. y Wendelaar-Bonga S.E. (1989). The movement of cadmium through freshwater trout branchial epithelium and its interference with calcium transport. J. Exp. Biol., 145: 185-197.
- Viarengo, A. (1985). Biochemical effects of trace metals. Mar. Pollut. Bull., 16: 153-158.
- Villanueva, S. y Botello A.V. (1998). Metal pollution in coastal areas of Mexico. Rev. Environ. Contam. Toxicol., 157: 53-94.
- Waldichuk, M. (1974). Some biological concerns in heavy metals pollution. En: W.B. Vernberg y F.J. Vernberg (Eds.) Pollution and Physiology of Marine Organisms. Academic Press, New York, 425 pp.
- Ward, G.S. y Parrish P.R. (1982). Manual of methods in aquatic environment research. Part 6 Toxicity test. Fao Fish. Tech. Pap., 185: 23-32.
- Weeks, J.M. (1993). Effects of dietary copper and zinc concentrations on feeding rates of two species of talitrid amphipods (crustacea). Bull. Environ. Contam. Toxicol., 50: 883-890.
- Weeks, J.M., Rainbow P.S. y Moore P.G. (1992). The loss, uptake and tissue distribution of copper and zinc during the moult cycle in an ecological series of talitrid amphipods (Crustacea:Amphipoda). Hydrobiologia, 245:15-25.
- Weis, J.S. (1978). Interaction of methylmercury, cadmium and salinity on regeneration in the fiddler crabs *Uca pugilator*, *U. pugnax* and *U. max*. Mar. Biol., 49:119-124.
- White, S.L. y Rainbow P.S. (1982). Regulation and accumulation of copper, zinc and cadmium by the shrimp *Palaemon elegans*. Mar. Ecol. Prog. Ser., 8:95-101.

- White, S.L. y Rainbow P.S. (1984). Regulation of zinc concentration by *Palaemon elegans* (Crustacea: Decapoda): zinc flux and effects of temperature, zinc concentrations and moulting. Mar. Ecol. Prog. Ser., 16: 135-147.
- White, S.L. y Rainbow P.S. (1986). Accumulation of cadmium by *Palaemon elegans* (Crustacea: Decapoda). Mar. Ecol. Prog. Ser., 32: 17-25.
- Woo, P.K., Syn Y.M. y Wong M.K. (1993) The effect of short term acute cadmium exposure on blue tilapia (*Oreochromis aureus*). Environ. Biol. Fish., 37: 67-74.
- Wong, C.K., Chu K.H., Tang K.W., Tam T.W. y Wong L.J. (1993). Effects of chromium, copper and nickel on survival and feeding behavior of *Metapenaeus ensis* larvae and postlarvae (Decapoda: Penaeidae). Mar. Environ. Res., 36: 63-78.
- Wong, C.K., Cheung J.K.Y., Chr K.H. (1995). Effects of copper on survival, development and growth of *Metapenaeus ensis* larvae and postlarvae (Decapoda:Penaeidae). Mar. Pollut. Bull., 31: 4-12.
- Zanders, I.P. y Rojas W.E. (1992). Cadmium accumulation, LC<sub>50</sub> and oxygen consumption in the tropical marine amphipod *Elasmopus rapax*. Mar. Biol., 113: 409-413.
- Zatta, P. (1984). Zinc transport in the haemolymph of *Carcinus maenas* (Crustacea: decapoda). J. Mar. Biol. Ass. U.K., 64: 801-807.
- Zirino, A. y Yamamoto S. (1972). A pH-dependent model for the chemical speciation of copper, zinc, cadmium and lead in seawater. Limnol. Oceanogr., 17: 661-671.
- Zyadah, M. A. y Abdel-Baky T. E. (2000). Toxicity and bioaccumulation of copper, zinc and cadmium in some aquatic organisms. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 64: 740-747.

# ANEXOS

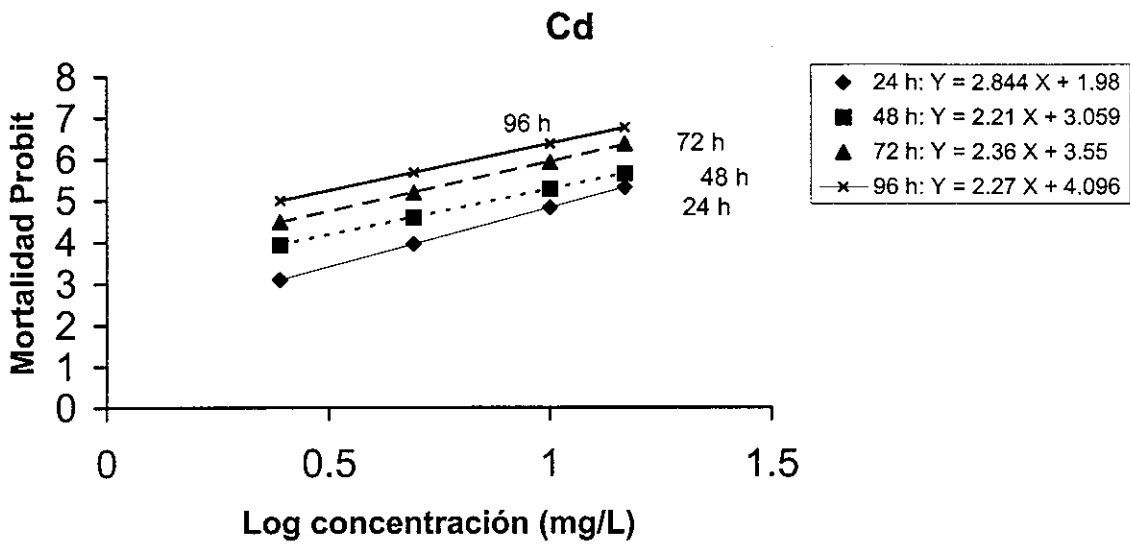


Figura 1.- Relación de la concentración de Cd (mg/L) con la mortalidad probit en postlarvas PL17 de *Litopenaeus vannamei*

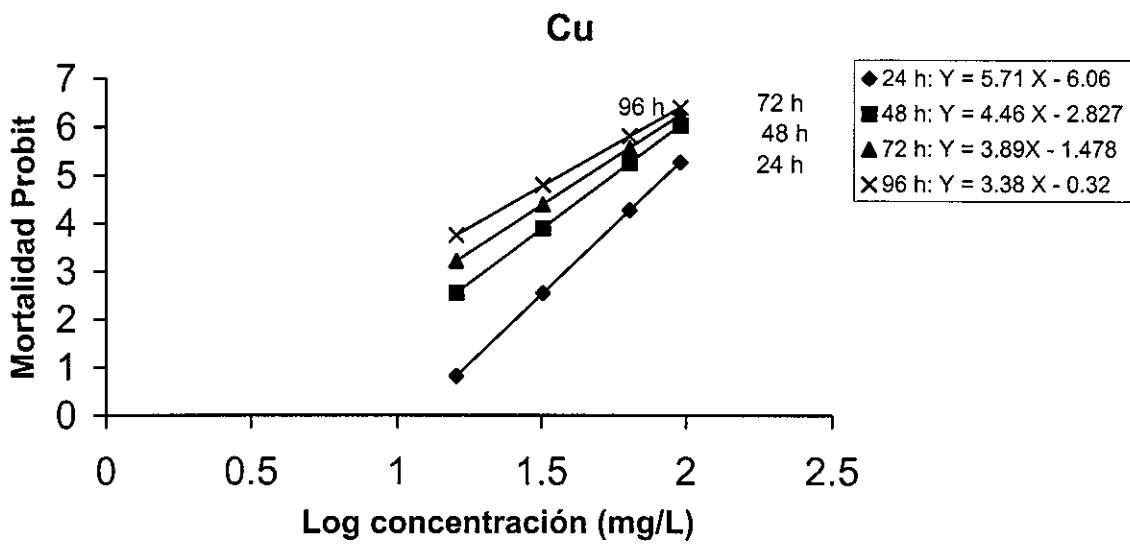


Figura 2.- Relación de la concentración de Cu (mg/L) con la mortalidad probit en postlarvas PL17 de *Litopenaeus vannamei*

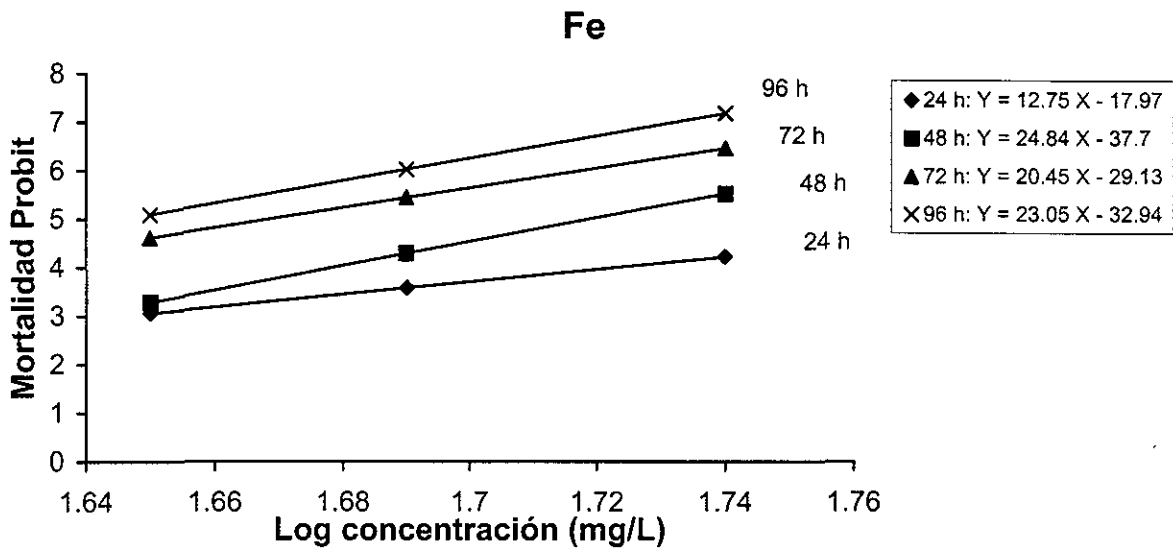


Figura 3.- Relación de la concentración de Fe (mg/L) con la mortalidad probit en postlarvas PL17 de *Litopenaeus vannamei*

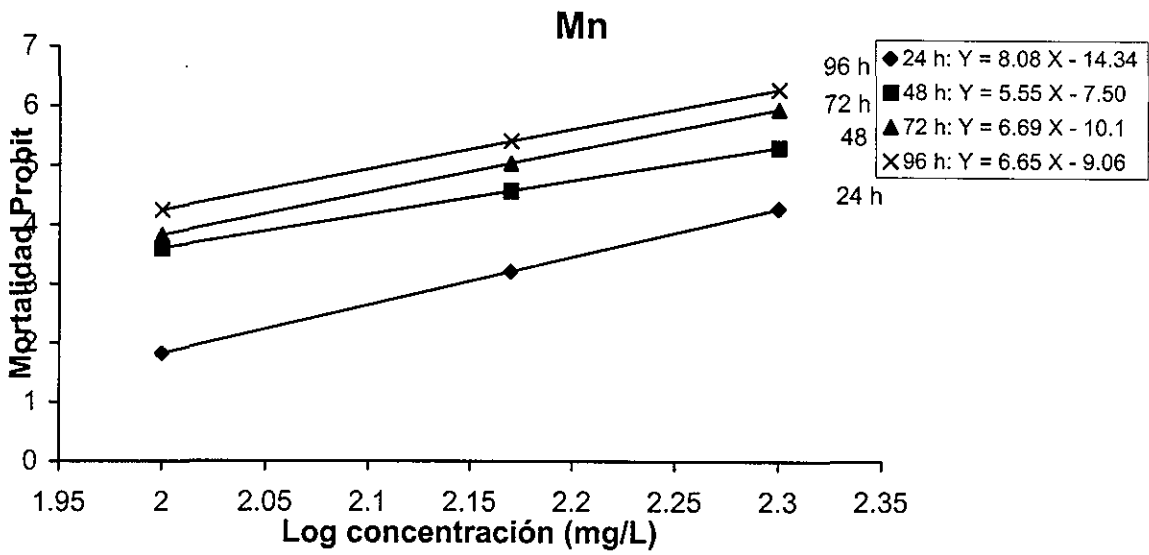


Figura 4.- Relación de la concentración de Mn (mg/L) con la mortalidad probit en postlarvas PL17 de *Litopenaeus vannamei*

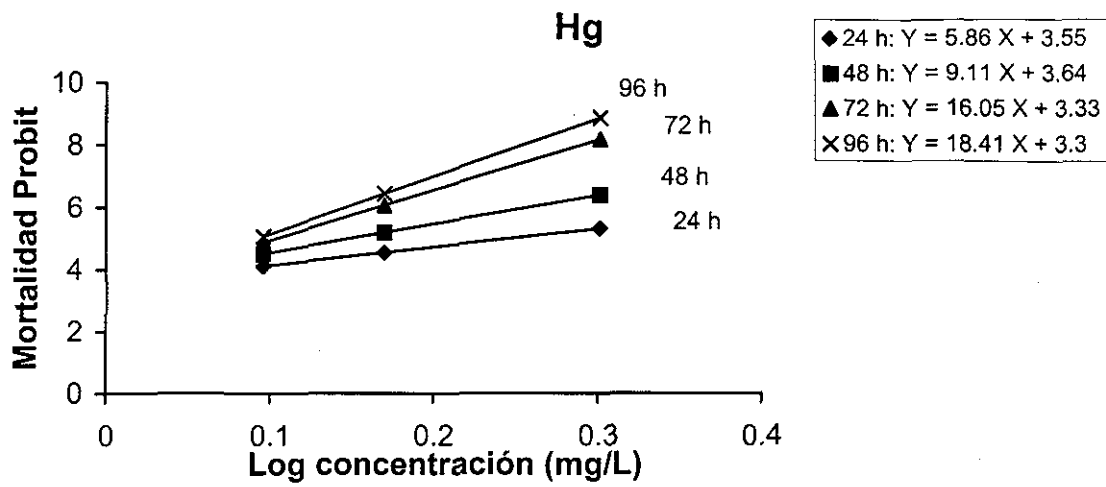


Figura 5.- Relación de la concentración de Hg (mg/L) con la mortalidad probit en postlarvas PL17 de *Litopenaeus vannamei*

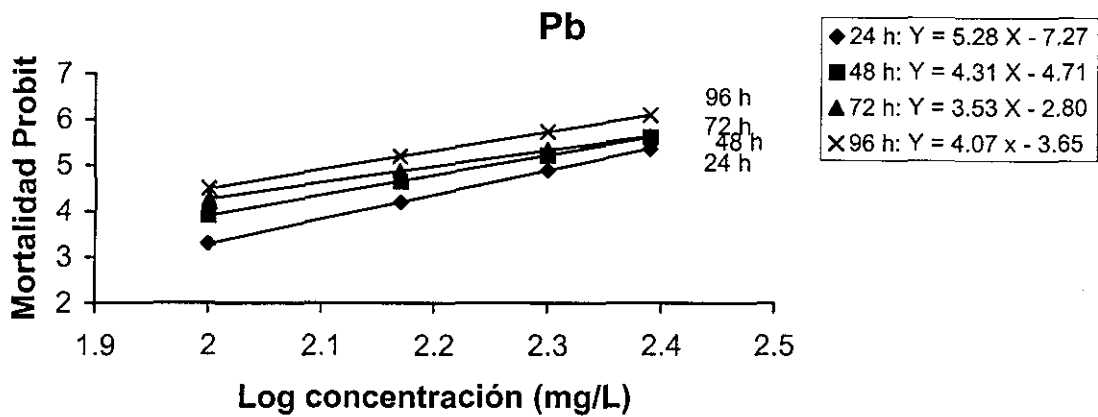


Figura 6.- Relación de la concentración de Pb (mg/L) con la mortalidad probit en postlarvas PL17 de *Litopenaeus vannamei*

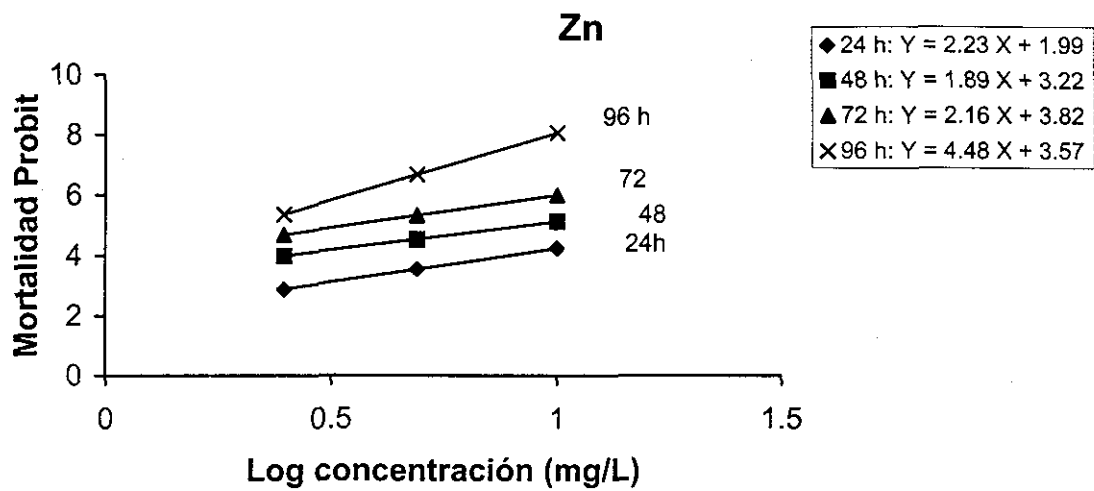


Figura 7.- Relación de la concentración de Zn (mg/L) con la mortalidad probit en postlarvas PL17 de *Litopenaeus vannamei*



## Acute Toxicity of Cadmium, Mercury, and Lead to Whiteleg Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) Postlarvae

M. G. Frías-Espéricueta,<sup>1,2</sup> D. Voltolina,<sup>3</sup> J. I. Osuna-López<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Marine Sciences and Limnology Postgraduate Program, Mazatlán Station, National Autonomous University of Mexico, Post Office Box 610, Mazatlán 82000, Sinaloa, Mexico

<sup>2</sup> Faculty of Marine Sciences, Autonomous University of Sinaloa, Post Office Box 610, Mazatlán 82000, Sinaloa, Mexico

<sup>3</sup> Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, CIBNOR-UAS Laboratory, Post Office Box 1132, Mazatlán 82000, Sinaloa, Mexico

Received: 13 November 2000/Accepted: 3 June 2001

Despite national policies regarding the use and management of coastal resources, pollution problems are increasing in Mexico and, at the current rates of input, metals contamination will become stressful to many ecosystems (Villanueva and Botello 1996), to the point that any level of exposure of the organisms participating in their food chains could cause severe disruptions of the normal functions of the biological systems, where the metals are accumulating.

The whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* is a tropical species that is geographically distributed from Sonora, Mexico, to northern Peru. It is cultured in extensive, intensive, and semi-intensive systems and is, together with *Litopenaeus stylirostris*, the most popular shrimp for aquaculture in Mexico as well as in other Central and South America countries. In the last decade, shrimp aquaculture has rapidly increased in Mexico, where most shrimp farms are located in zones with high agricultural activities, high use of pesticides, and in which studies carried out for more than 25 years have demonstrated high concentrations of Hg, Pb, Cd, Cr, Ni and Zn (Villanueva and Botello 1996). However, information about metal toxicity for these organisms is scarce. This paper provides information on the mortality of *L. vannamei* postlarvae, exposed under laboratory conditions to individual concentrations of Cd, Hg and Pb, the three heavy metals widely recognized as the most toxic in our environment.

### MATERIALS AND METHODS

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Postlarvae (PL12) were obtained from a commercial facility located close to Mazatlán (Mexico), and held for three days under laboratory conditions in a 50 l stocking tank. During acclimation the postlarvae were fed with *Artemia* sp. nauplii, and seawater was changed every day (Buikema et al. 1982). The mean wet weight of postlarvae was  $4.22 \pm 1.35$  mg. Seawater used in the bioassays was pumped from the Mazatlan Bay and was filtered through a sand and gravel bed, one cartridge system of 10, 5 and 1  $\mu\text{m}$ , and finally treated with activated charcoal. Chemical characteristics of filtered seawater are given in Table 1; each value was calculated with conventional methods (APHA- AWWA-WPCF 1992).

Metal test solutions were prepared by dissolving the required amounts of CdCl<sub>2</sub>, HgCl<sub>2</sub> and PbCl<sub>2</sub> (Baker GR grade) in seawater. The concentrations of total Cd, Hg and Pb (nominal concentrations) ranged from 1 to 25, 0.5 to 3, and 60 to 350 mg L<sup>-1</sup>, respectively. Throughout the experiments salinity was 34 ppt, pH ranged between 8.0 and 8.1, and water temperature was 26-27°C.

**Table 1.** Chemical characteristics of seawater used in bioassays

Parameter	Dissolved metals (µg L <sup>-1</sup> )
Total alkalinity: 2.12-2.15 meq L <sup>-1</sup>	Cd: 0.3-0.4
PH: 8-8.1	Cr: 0.14-0.15
Ammonia-N: 9-13 µg L <sup>-1</sup>	Cu: 8-13
Nitrite-N: 4-5.3 µg L <sup>-1</sup>	Fe: 1.6-2.9
Nitrate-N: 222-284 µg L <sup>-1</sup>	Mn: 1.5-2.3
Phosphate-P: 70-83 µg L <sup>-1</sup>	Pb: 1.1-1.3
	Zn: 67-85

Short-term (24, 48, 72, and 96 hr) median lethal concentration (LC<sub>50</sub>) toxicity tests were conducted following the methods described by APHA-AWWA-WPCF (1992), and Buikema et al. (1982). Postlarvae were sampled randomly from the stocking tank and placed in triplicate 600 ml glass beakers for each of the treatments where they were kept for three days before bioassays, with 12 hr light: 12 hr dark cycle. All glassware was acid-washed before use. Each flask containing 300 ml of test solution and 10 test postlarvae, was aerated by an airstone, and feeding was the same as during the acclimation period. Each test solution and the control seawater medium were renewed daily, in accordance with a static renewal method for toxicity tests (Buikema et al. 1982), and postlarvae were not transferred to new flasks. During the experiment, dissolved oxygen was 5.49 ± 0.34 mg L<sup>-1</sup> in all containers. All observations on survival and culture conditions were carried out at 12-hr intervals. Death was assumed when postlarvae were non-motile and showed no response when touched with a glass rod. Controls were run in parallel with similar conditions.

LC<sub>50</sub> values and their 95% confidence limits for total metals were calculated with a computer program based upon a method described by Finney (1971), transforming the mortality data in probit mortality. With this method, the estimated probit line and results of a chi-square test for goodness of fit were determined. A z-test for the comparison of two LC<sub>50</sub> values at the 5% level of significance (APHA-AWWA-WPCF 1992) were carried out between each LC<sub>50</sub> value.

A valid criticism of bioassays is that the results obtained with only one group of test organisms are considered as representative of the species in question. To avoid this problem, we obtained the LC<sub>50</sub> of the three metals using 5-6 groups of

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

postlarvae at different times and from different broodstocks, to test the toxicity of different concentrations of each metal in each of these separate experiments.

## RESULTS AND DISCUSSION

No shrimp died in the controls run in parallel with the bioassays of postlarvae exposed to different concentrations of total Cd, Hg, and Pb. With regard to Cd, no shrimp died in 1 mg L<sup>-1</sup> during the first 48 hr of exposure. In 1, 2.5, 5, and 10 mg L<sup>-1</sup> total Cd, mortalities of 20, 56.6, 60, and 93.3% were recorded, respectively, after 96 hr exposure and a 100% mortality occurred in 15, 20, and 25 mg L<sup>-1</sup> at 96, 72, and 12 hr of exposure, respectively. According to Landis and Yu (1999) the main biochemical effects of Cd are: (a) it can bind with SH-containing ligands in the membrane and other cell constituents, causing structural and functional disruptions, and (b) it can uncouple oxidative phosphorylation and impair the cell energy metabolism.

Mortalities in 0.5, 1, 1.25, and 1.5 mg L<sup>-1</sup> total Hg were 0, 6.6, 46.6, and 96.6%, respectively; while in 2, 2.5, and 3 mg L<sup>-1</sup>, 100% mortality occurred at 72, 48, and 24 hr, in the order. Hg is considered highly toxic to all living organisms, and its toxicity is due to (a) inhibition of a high variety of enzyme systems (with thiol ligands) and (b) because it inhibits active transport mechanisms through dissipation of normal cation gradient and destroys mitochondrial apparatus. In addition it causes swelling of cells leading to lysis (Landis and Yu 1999).

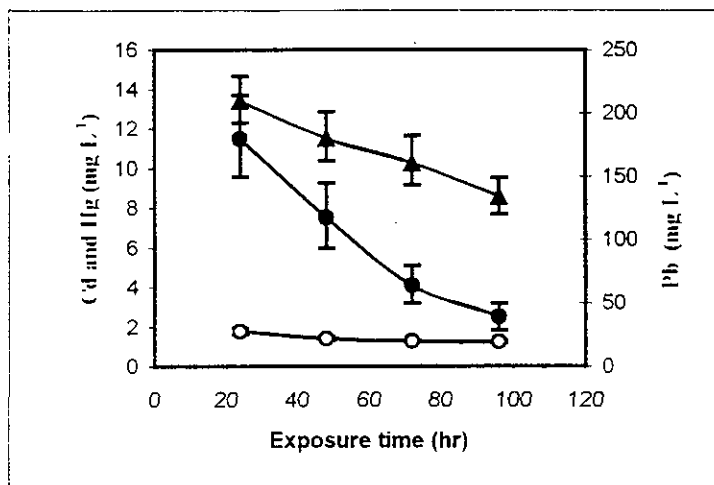
Regarding total Pb, mortalities of 10, 23.3, 33.3, 36.6, 50, 66.6, and 90% were noted in 60, 80, 100, 125, 150, 200, and 250 mg L<sup>-1</sup>, respectively; while 100% mortality was observed in 300 and 350 mg L<sup>-1</sup> at 48 and 24 hr of toxic exposure, respectively. Landis and Yu (1999) pointed out that (a) Pb has a high affinity for the sulfhydryl group (SH) and therefore some enzymes are inhibited; (b) Pb is similar in many aspects to Ca and may perform a competitive action on mitochondrial respiration and neurological function and (c) Pb can interact with nucleic acids, leading to either decreased or increased protein synthesis.

Body concentrations of non-essential metals as Cd or Hg do not appear to be regulated by any crustacean, decapod or otherwise. Therefore, these metals accumulate to high levels in the tissues (Zanders and Rojas 1992) causing death of the test organisms.

During late proecdysis and ecdysis shrimps take water to increase their size, resulting in hydration of their tissues and an increase in the blood volume (Dall et al. 1990). This water influx would favour metal accumulation in postlarvae, possibly causing the lethal effect. According to Zanders and Rojas (1992), the physiology and the metabolic responses of crustaceans to heavy metal exposure appear to be strongly affected by the molting cycle. In our study, some postlarvae

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

113



**Figure 1.** LC<sub>50</sub> values and 95% confidence limits for total Cd ( ● ), Hg ( ○ ) and Pb ( ▲ ) in *L. vannamei* postlarvae (PL18) exposed from 24 to 96 hr

reached the ecdysis phase, and no relation was observed between mortality and ecdysis in the case of the Cd and Pb bioassays. In Hg bioassay, no mortality was found in 0.5 mg L<sup>-1</sup>, in spite of the fact that 20% reached the ecdysis stage; indicating the existence of defense mechanisms, such as metallothioneins, which tend to bind actively with Hg (Landis and Yu 1999) and decrease its toxicity in the test organisms. However, in 1.25 mg L<sup>-1</sup>, only the individuals that died during the first 60 hr of exposure, were in ecdysis stage. Zanders and Rojas (1992) observed that most of the amphipod *E. rapax* which died during the first 24-48 hr of Cd exposure were in the ecdysis phase.

LC<sub>50</sub> values and their 95% confidence limits (error bars) for total Cd, Hg and Pb are shown in the Fig. 1 and table 2. A comparison between the LC<sub>50</sub> (APHA-AWWA-WPCF 1992) for each bioassay at different exposure times, was carried out. This analysis revealed no significant difference ( $P < 0.05$ ) between 72-hr and 96-hr for total Hg, and 48-hr and 72-hr for total Pb. Significant differences ( $P < 0.05$ ) were observed between all Cd values and the others comparisons for total Hg and Pb.

Statistical analysis showed that the probit of mortality had a positive linear relationship with each metal, and that all values of the chi-square test were less than the tabulated critical value for  $P < 0.05$ , suggesting that the distribution of every mortality value (probit of mortality) was close to the estimated probit lines (Finney 1971).

During the Pb assay we observed the presence of particulates at the bottom of the experimental vessels. For the quantities added of 50, 100, 150, 200, 250, 300, and 350 mg L<sup>-1</sup> of total lead, dissolved lead determined by atomic absorption spectrophotometry, was 0.44, 1.72, 3.09, 7.7, 11.6, 20.2, and 57.2 mg L<sup>-1</sup>.

respectively. Although dissolved metals are considered more toxic since they are more easily absorbed by aquatic organisms than the particulate fraction, we decided report our results as a function of total lead: rather than dissolved Pb concentrations since, due to benthic behavior, our test organisms were always in contact with the particulate, as well as with the dissolved lead and were in fact observed browsing among the precipitates present at the bottom of the experimental containers.

**Table 2.** 96-hr LC<sub>50</sub> values (mg L<sup>-1</sup>) of total Cd, Hg, and Pb for several crustacean species

Species	Cd	Hg	Pb	Author
<i>Palaemon serratus</i> (larvae)*	1.68	0.074		Mariño-Balsa et al. (2000)
<i>Maja squinado</i> (larvae)*	0.158	0.072		Mariño-Balsa et al. (2000)
<i>Paragrapsus quadridentatus</i> (larvae)	0.49			Ahsanullah and Arnott (1978)
<i>Cancer irroratus</i> (larvae)	0.25			Benijts-Claus and Benijts (1975)
<i>Rhithropanopeus harrisi</i> (larvae)	3.37			Thorpe and Costlow (1989)
<i>Palaemonetes pugio</i> (larvae)	1.88			Thorpe and Costlow (1989)
<i>Penaeus japonicus</i> (larvae)	0.03			Bambang et al. (1994)
<i>Homarus americanus</i> (larvae)	0.078	0.02		Johnson and Gentile (1979)
<i>Palaemonetes pugio</i> (larvae)		2.6		Kraus and Kraus (1986)
<i>Penaeus setiferus</i> (postlarvae)		0.017		Green et al. (1976)
<i>Procambarus clarkii</i> (juvenile)			751	Naqvy and Howell (1993)
<i>Gammarus pseudolimnaeus</i> (adult)			0.124	Spehar et al. (1978)
<i>Palaemon elegans</i> (juvenile)			167	Lorenzon et al. (2000)
<i>Cancer magister</i> (larvae)	0.247	0.082	0.575	Martin et al. (1981)
<i>Scylla serrata</i> (adult)	18	0.68	>370	Krishnaja et al. (1987)
<i>L. vannamei</i> (postlarvae)	2.49	1.23	134	This study

\* 72-hr LC<sub>50</sub> values

Our 96-hr LC<sub>50</sub> value for Cd was 2.49 mg L<sup>-1</sup>, well within the interval reported. Postlarvae of *L. vannamei* were more tolerant than most of larval crustaceans, but less tolerant than the adults of *Scylla serrata*, probably because adult crustaceans are more tolerant to heavy metals than their larval/postlarval (Mariño-Balsa et al. 2000).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

115

Regarding Hg, Bianchini and Gilles (1996) pointed out that  $1 \text{ mg L}^{-1}$  Hg was lethal for the crabs *Eriocheir sinensis* and *Carcinus maenas*, and Mance (1987) reported  $\text{LC}_{50}$  of  $0.1 \text{ mg L}^{-1}$  for marine crustaceans adult and larvae exposed to Hg. This study agrees with several previous investigations, which show that marine species are much more susceptible to Hg than Cd and Pb and other metals.

According to Krishnaja et al. (1987) the Pb tolerance of decapods is high, since they may accumulate high concentrations of Pb without any lethal effects. This explains why the  $\text{LC}_{50}$  values for Pb are the highest found in this work.

Toxicity data of this kind provide biological criteria to establish quality standards that protect resources of the coastal environment. In fact, it has been suggested that they may be used to obtain the maximum permissible concentrations (MPC), with a protection factor of 100 according to the formula:  $\text{MPC} = \text{LC}_{50}/100$  (Mariño-Balsa et al. 2000). In this case, the MPC for rearing of *L. vannamei* would be 0.012, 0.024 and  $1.3 \text{ mg L}^{-1}$ , for Hg, Cd and Pb, respectively. However, the first physiological response of organisms to sublethal concentrations might occur at molecular level (Lorenzon et al. 2000), and this must be investigated in *L. vannamei* to validate the MPC calculated from these acute toxicity tests.

Osuna-López et al. (1989), found in the Northwest coast of Mexico an interval for Cd and Pb of 0.02-3 and 1.1-9.3  $\mu\text{g L}^{-1}$ , respectively. In this context, the MPC obtained here has important implications for shrimp pond management, especially in the grow-out units of the Northwest coast of Mexico, where shrimp culture is increasing. Therefore, the interaction between metals and shrimp is an important consideration, and the synergism of these metals must be object of further studies.

*Acknowledgments.* This work was partially supported by the CONACYT (project 32501-T). The authors thank the company Maricultura del Pacifico for providing postlarvae. Ma. A. Herrera-Vega, G. Barrón-Gallardo and H. Bojórquez for their technical assistance; F. Páez-Osuna and Ma. E. De la Rosa-Duque for comments.

## REFERENCES

- Ahsanullah M, Arnott GH (1978) Acute toxicity of copper, cadmium and zinc to larvae of the crab *Paragrapsus quadridentatus* and implications for water quality criteria. Australian J Mar Freshwater Res 29:1-8
- APHA-AWWA-WPCF (1992) Standard methods for the examination of water and wastewater. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Pollution Control Federation, Washington
- Bambang Y, Charmantier G, Thuet P, Trilles JP (1994) Effect of cadmium on survival and osmoregulation of various developmental stages of the shrimp *Penaeus japonicus* (Crustacea:Decapoda). Aquatic Toxicol 33:128-139

- Benijts-Claus C. Benijts P (1975) Sublethal effects of toxic chemical on aquatic animals. Elsevier. Amsterdam. p 155
- Bianchini A. Gilles R (1996) Toxicity and accumulation of mercury in three species of crabs with different osmoregulatory capacities. Bull Environ Contam Toxicol 57:91-98
- Buikema AL. Niederlehner RR. Cairns JJ (1982) Biological monitoring Part IV. Toxicity testing. Water Res 16:239-262
- Dall W. Hill BJ. Rothlisberg PC. Sharples DJ (1990) The Biology of the Penaeidae. In: Blaxter and Soutward (ed) Advances in Marine Biology, vol 27. Academic Press, San Diego. p 489
- Finney D (1971) Probits Analysis. 3rd ed. Cambridge Univ. Press, Cambridge
- Kraus ML. Kraus DB (1986) Differences in the effects of mercury on predator avoidance in two populations of the grass shrimp *Palaemonetes pugio*. Mar Environ Res 18:277-289
- Krishnaja AP. Rege MS. Joshi AG (1987) Toxic effects of certain heavy metals (Hg, Cd, Pb, As and Se) on the intertidal crab *Scylla serrata*. Mar Environ Res 21:109-119
- Landis WG. Yu MH (1999) Introduction to environmental toxicology. Lewis Publishers. New York
- Lorenzon S. Francese M. Ferrero EA (2000) Heavy metal toxicity and differential effects on the hyperglycemic stress response in the shrimp *Palaemon elegans*. Arch Environ Contam Toxicol 39:167-176
- Mariño-Balsa JC. Poza E. Vazquez E. Berras R (2000) Comparative toxicity of dissolved metals to early larval stages of *Palaemon serratus*, *Maja squinado*, and *Homarus gammarus* (Crustacea:Decapoda). Arch Environ Contam Toxicol 39:345-351
- Marin M. Osborn KE. Billig P. Glickstein N (1981) Toxicities of ten metals to *Crassostrea gigas* and *Mytilus edulis* embryos and *Cancer magister* larvae. Mar Pollut Bull 12: 305-308
- Naqvi SM. Howell RD (1993) Toxicity of cadmium and lead to juvenile red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*, and effects on fecundity of adults. Bull Environ Contam Toxicol 51:303-308
- Osuna-López JI. Páez-Osuna F. Marmolejo-Rivas C. Ortega-Romero P (1989) Metales pesados disueltos en el puerto de Mazatlán. Anales Inst Mar Limnol Univ Nal Autón Méx 16:307-320
- Spehar RL. Anderson RL. Fiant JT (1978) Toxicity and bioaccumulation of cadmium and lead in aquatic invertebrates. Environ Pollut 15:198-208
- Thorpe GJ. Costlow JD (1989) The relation of the acute (96-h) uptake and subcellular distribution of cadmium and zinc to cadmium toxicity in larvae of *Rhithropanopeus harriss* and *Palaemonetes pugio*. In: Cowgill and Williams (Eds) Aquatic Toxicology Assessment. Vol 12 ASTM, Philadelphia
- Villanueva SN. Botello AV (1996) Metal pollution in coastal areas of Mexico. Rev Environ Contam Toxicol 157:53-94
- Zanders IP. Rojas WE (1992) Cadmium accumulation, LC<sub>50</sub> and oxygen consumption in the tropical marine amphipod *Elasmopus rapax*. Mar Biol 113:409-413

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN