



00381 28
2ej

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

EFFECTOS SUBLETALES DEL CADMIO Y
ZINC EN *Panaeus setiferus*

T E S I S

Que para obtener el Grado Académico de
DOCTORA EN CIENCIAS (BIOLOGIA)

P r e s e n t a:

M. en C. RUTH CECILIA VANEGAS PEREZ

1996

Directora de Tesis: Dra. Sonia Sofía Espina Aguilera

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.

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Ecofisiología de la Facultad de Ciencias y en la Estación El Carmen del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM, bajo la Dirección de la Dra. Sonia Espina Aguilera.

DEDICATORIAS

A mi familia. A mis queridos padres Juan y Nohemi por que al final de este camino estamos juntos. Por su apoyo y amor incondicional.

A Betty, Javier y la pequeña Christy; a Mary, Sergio y la enorme Alejandra y a Juan, por todos los años que hemos compartido, por su cariño, apoyo y comprensión a toda prueba.

A Guille, gran compañera y amiga, por compartir tantas experiencias, enormes retos y muchas grandezas.

A Paco, por su amistad, su confianza y su apoyo sin medida.

A Alejandra magna

AGRADECIMIENTOS

La realización de este trabajo es producto del apoyo y participación de varias instituciones y numerosas personas. A todas ellas deseo manifestar mi mayor agradecimiento.

A La Dra. Sonia Sofia Espina Aguilera, Directora de esta Tesis, por haberme iniciado en el quehacer científico, instaurando la base de mi formación académica; por su confianza, su apoyo a lo largo de muchos años y por su amistad. Gracias !!!.

Al Dr. Alfonso Vázquez-Botello, Asesor de este trabajo, por su invitación inicial para trabajar en el área de Ecotoxicología que entre otros aspectos, cristalizó en esta Tesis. Por su confianza y su constante apoyo a lo largo de mis estudios de Doctorado.

Al Dr. René Cárdenas, miembro del Comité Tutorial, por su contribución en la evaluación de la actividad enzimática; por su tiempo y por sus constantes comentarios y sugerencias para mejorar este proyecto. Gracias por su confianza .

A los miembros del Sinodo, Dra. Irma Rosas, Dra. Guillermina Alcaraz, Dr. Xavier Chiappa, Dr. Luis Soto y Dr. Rafael Villalobos, que aportaron muchas y muy valiosas sugerencias para mejorar el trabajo escrito.

A la Dra. Guillermina Alcaraz por su apoyo constante en todas las fases de este Proyecto y por su amistad.

Al Dr. Xavier Chiappa, por su colaboración en el Análisis Estadístico y por su amistad.

Al Dr. Alfredo Salibián, por sus sugerencias y comentarios al trabajo que permitieron darle una mayor solidez.

A mis compañeros Hugo Molina y Vicente Castro por atreverse a compartir conmigo esta aventura y por su apoyo en el trabajo experimental. Sin su compromiso, dedicación y confianza no hubiera sido posible realizar este Proyecto. Gracias equipo.

Al Dr. Rafael Pérez Pascual, Director de la Facultad de Ciencias, por el amplio apoyo institucional brindado.

Al Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, por el apoyo institucional y por las facilidades para el transporte de material y equipo a la Sede El Carmen, donde se llevó a cabo la fase experimental de este estudio.

Al M. en C. Francisco Vera, Jefe de la Sede El Carmen del ICMYL, por su enorme esfuerzo, su confianza y constante apoyo durante la realización de la fase experimental de este trabajo. Por

su amistad. Gracias a ello fue posible la adecuación del área experimental en la cual se desarrolló este trabajo.

A Andrés Reda, Técnico Académico de la Sede El Carmen del ICMYL, por su colaboración en la captura de los organismos.

A todo el personal académico y administrativo de la Sede el Carmen, por que nuestro trabajo fue mucho más placentero gracias a su apoyo y amistad. A Armando Ortega, Rocío Hernández, Elsa Santibón, Hernán Alvaraz-Guillén, Juan Luis Casanova y a la querida Angelina.

A Laura Cárdenas, por su colaboración y participación en la adecuación del área experimental. A Anita, por su risa franca y nuestra convivencia en la Sede el Carmen.

A la Biól. Susana Villanueva, del Laboratorio de Contaminación Marina del ICMYL por su valioso apoyo técnico en la determinación de los metales pesados.

Al Sr. Jesús Saenz Jefe del Area de Servicios y al Sr. Saúl Orta, Jefe del Taller Mecánico de la Facultad de Ciencias, por su solidaridad y colaboración para fabricar, armar e inventar mucha de la infraestructura necesaria para el montaje del Laboratorio Experimental.

A Ralstrom Purina de México, especialmente al Dr. Jesús Cendejas por la donación del alimento (Camaronina) utilizado en este estudio.

A mis compañeros del Laboratorio de Ecofisiología por su apoyo y amistad, especialmente a Carlos Rosas, Adolfo Sánchez, Gabriela Gaxiola y Fabián Contreras. Asimismo a Cecilia Robles, Luz Chacón, Verónica Espinoza y Hugo Molina, por compartir con enorme paciencia y comprensión la etapa final de este trabajo. A todo el equipo del Grupo Camarón UNAM.

A mis compañeros y partícipes de esta historia, Sergio Guillén, Patricia Campos, Enrique Lira, Emilio Tobón, Carolina Valdespino y Martín Merino por compartir tantas experiencia y por su amistad a lo largo de estos años. A la Dra. Margarita Collazo y a Mercedes Perelló por su apoyo y amistad.

A Rosalía Valadez y Nicolás Cano, mis angeles de la guarda, por su cariño y generosidad. Al Dr. Alfonso Zamora, por su apoyo profesional y personal.

A todo el personal admimstrativo de la Facultad de Ciencias.

Especialmente agradezco a la Dirección Genral de Asuntos del Personal Académico de la UNAM por la beca otorgada para realizar los estudios de Doctorado, así como al apoyo financiero a través de PADEP (Proyecto No. 003317) para el desarrollo de la Tesis Doctoral.

INDICE

	Página
RESUMEN	i
ABSTRACT	ii
INTRODUCCIÓN	1
Objetivos	6
AREA DE ESTUDIO	8
MATERIALES Y METODOS	
A. Captura y Mantenimiento	11
B. Determinación del Punto Isosmótico	13
C. Pruebas de Toxicidad Aguda: CL50-96 h	14
D. Pruebas de Toxicidad Crónica	17
1. Balance Hidrosalino	18
Presión Osmótica	19
Cloruro Plasmático	19
ATPasas Branquiales	19
Contenido Corporal de Agua	21
2. Balance Energético	22
Ingestión (I)	22
Asimilación (A)	23
Respiración (R)	24
Excreción Nitrogenada (N)	25
Exuvia (E)	26
Campo de Crecimiento (P)	27
3. Bioacumulación	27
E. Análisis Estadístico	28
RESULTADOS	
A. Morfometría	30
B. Determinación del Punto Isosmótico	31
C. Pruebas de Toxicidad Aguda: CL50-96 h	33
D. Pruebas de Toxicidad Crónica	35
1. Mortalidad	35

2. Balance Hidrosalino	38
Presión Osmótica	39
Cloruro Plasmático	42
ATPasas Branquiales	45
Contenido Corporal de Agua	49
3. Balance Energético	52
Ingestión (I)	53
Asimilación (A) y Eficiencia de Asimilación (U)	54
Respiración (R)	57
Excreción Nitrogenada (N)	60
Exuvia (E)	62
Campo de Crecimiento (P)	62
Eficiencias de Crecimiento Bruta (K1) y Neta (K2)	67
4. Relación Atómica O/N	70
5. Bioacumulación	70
DISCUSION	78
Mortalidad	79
Bioacumulación	82
Balance Hidrosalino	86
Balance Energético	90
COCLUSIONES	101
LITERATURA CITADA	104
ANEXOS	114

RESUMEN

En el presente estudio se evaluó el efecto tóxico del cadmio, del zinc y de las mezclas de ambos en dos razones de toxicidad (RT) en los juveniles de *Penaeus setiferus* de la Laguna de Términos, Campeche. Todos los experimentos se efectuaron a $24 \pm 1^\circ\text{C}$ y $11 \pm 1 \text{‰ S}$, correspondientes a la temperatura promedio de la época de Nortes de la región y a la salinidad en la cual se determinó el punto isosmótico de la especie. El valor de la $CL_{50-96 \text{ h}}$ obtenida para el cadmio ($0.99 \pm 0.20 \text{ mg/L}$) reflejó una toxicidad 44 veces mayor que el zinc ($43.87 \pm 21.36 \text{ mg/L}$). Al exponer los camarones a las mezclas de cadmio y zinc en dos razones de toxicidad (RT 1:1 y 2.3:1) las unidades de toxicidad en las cuales se obtuvo el 50% de la mortalidad de los camarones ($UT_{50-96 \text{ h}}$) fueron de 0.31 y 0.28 respectivamente. Los resultados obtenidos reflejaron el efecto tóxico sinérgico de los metales, donde la toxicidad dependió de la razón de los metales en las mezclas. El efecto a largo plazo de cada metal y de sus mezclas se evaluó en especímenes expuestos por 21 días a diferentes concentraciones de cadmio y zinc y por 15 días a diferentes UT en dos RT, 1:1 y 2.3:1. En los camarones expuestos al cadmio, la bioacumulación se relacionó con las concentraciones externas; los expuestos al zinc, regularon el contenido corporal debido en parte a la desintoxicación del metal por la exuvia. La exposición a las mezclas de Cd y Zn alteró la regulación interna del zinc y deterioró la funcionalidad de la muda en la eliminación del metal; la bioacumulación de ambos metales se relacionó con la RT de los metales en la mezcla. La alteración en la presión osmótica de la hemolinfa, la actividad enzimática de las ATPasas en branquia, los niveles de cloruro plasmático y el contenido corporal de agua sugieren que tanto el cadmio como el zinc y en mayor grado las mezclas, alteran el balance hidrosalino de *P. setiferus*. Las modificaciones observadas en las tasas de ingestión, asimilación, respiración, excreción nitrogenada y muda, señalan que cada metal y sus mezclas ejercen efecto tóxico a diferente nivel. En los camarones expuestos de manera aislada al Cd y al Zn, las alteraciones se relacionaron con la toxicidad particular de cada metal; en mezclas, fueron consecuencia de la interacción compleja de ambos metales. La evaluación del campo de crecimiento a través del balance energético proporcionó una medida integradora del deterioro funcional de los camarones por la acción tóxica de los metales. En todos los grupos experimentales se observó una disminución de la energía potencial de crecimiento atribuida principalmente a la reducción de la energía del alimento ingerido y asimilado y la canalizada a la respiración; la reducción más drástica (62 al 78 %) se observó en los camarones expuestos a la mezcla del cadmio y zinc en una RT de 2.3:1, relacionada con la mayor mortalidad. En este grupo también se observaron las menores eficiencias de crecimiento bruta ($K_1 = 12$ a 21) y neta ($K_2 = 15$ a 26). En todas las condiciones experimentales, los camarones utilizaron proteínas como sustrato energético lo cual sugiere que la relación atómica O:N no es un indicador adecuado del efecto estresante de los metales pesados. La combinación del análisis de la bioacumulación de los metales y la evaluación de las alteraciones biológicas producidas en el marco de la energética fisiológica, permitió establecer la relación causa-efecto de la exposición a largo plazo del cadmio, del zinc y evaluar las modificaciones generadas por la interacción de los metales. Se establece que el campo de crecimiento es un índice general de estrés adecuado para evaluar el efecto tóxico de los metales en los juveniles del camarón blanco *Penaeus setiferus*.

ABSTRACT

In this study, the toxic effect of cadmium, zinc and their mixtures at two toxicity ratios, was evaluated in juvenile shrimps of *Penaeus setiferus* from Terminos Lagoon, Campeche. All experiments were conducted at $24 \pm 1^\circ\text{C}$ and $11 \pm 1\text{‰}$ S, related with the winter storm season temperature of the zone and the salinity in which the isosmotic point of the species was determined. The CL_{50-96} h obtained for cadmium (0.99 ± 0.20 mg/L) and for zinc (43.87 ± 21.36 mg/L) showed that the former was 44 times more toxic than the latter. When shrimps were exposed to cadmium and zinc mixtures at 1:1 and 2.3:1 TR, the TU where 50% of mortality (TU_{50-96} h) were attained at 0.31 and 0.28, respectively; these results reflected the synergistic action of metals, where toxicity depended of the metals ratio in mixtures. The long-term effect of each metal and its mixture was evaluated in shrimps exposed for 21 days to different concentrations of cadmium and zinc, and for 15 days to different TU at two TR of Cd/Zn mixtures. Bioaccumulation in organisms single exposed to cadmium was related with external concentrations. In shrimps only exposed to zinc, corporal regulation was observed partially due to metal detoxification by exuviae. However, internal regulation of zinc and the functionality of the exuviae in metals excretion was lost in shrimps co-exposed to Cd/Zn mixtures; bioaccumulation of heavy metals was related with the TR of mixtures. Alterations of blood-serum osmolality, branchial ATPases activity, haemolymph chloride concentrations and body water content, suggested that single exposure to cadmium and zinc and in higher degree to metals co-exposure, deteriorated the permeability and transport mechanisms of branquial tissue and in consequence, the ionic and osmotic regulation of *P. setiferus*. Modifications in ingestion, assimilation, respiration, nitrogen excretion and exuviae rates showed that toxicity of each metal and their mixtures was exerted at different level. In shrimps single exposed to Cd and Zn, biological alterations were related with the particular toxicity of each metal; in mixtures, were consequence of the complex interactions of both metals. The evaluation of scope for growth through organism's energetic balance provided an integrated measure of the functional impairment caused by the toxic action of heavy metals. In all experimental groups, a marked decline in scope for growth was observed due to reductions in the energy incorporated and assimilated from food and an increase in metabolic energy expenditure. The more drastic reduction (62 to 78%) was observed in shrimps exposed to a 2.3:1 TR mixture, related with the highest mortality recorded. In this group, the lower gross growth efficiency ($K_1 = 12$ to 21) and net growth efficiency ($K_2 = 15$ to 26) were also observed. The use of proteins as energetic substrate in all experimental conditions, suggested that O:N atomic ratio is not a suitable index of stressful effects on heavy metals. The combined analysis of cadmium and zinc bioaccumulation and the evaluation of the biological effects in terms of physiological energetics, allowed to settle the dose-effect relations of each metal and their interactions. It is established that scope for growth is an appropriate and sensible general index to assess the toxic effect of heavy metals in *P. setiferus* juveniles.

INTRODUCCION

Las lagunas costeras y estuarios son receptores de elevadas concentraciones de compuestos tóxicos debido al incremento de las actividades agrícolas e industriales, así como al aumento del desarrollo urbano de las zonas costeras. En estos ecosistemas, destaca la presencia de pesticidas, hidrocarburos y metales pesados (Patin, 1982; Botello *et al.*, 1992). En los ambientes lagunares-estuarinos se detectan metales pesados como el cromo, plomo, mercurio, plata, aluminio y estaño, entre otros, que aunque presentes en concentraciones traza en los tejidos de plantas y animales, no tienen una función biológica conocida; entre los metales esenciales, se encuentran el zinc, hierro, cobre, iodo, manganeso, molibdeno, selenio, níquel y otros, los cuales son necesarios para el desarrollo y crecimiento normal de los organismos. Sin embargo en elevadas concentraciones, ambos tipos de metales pueden ser altamente tóxicos (Niagru y Sprague, 1987; Rand y Petrocelli, 1984).

El cadmio, uno de los elementos más adversos para la biota acuática, frecuentemente se encuentra presente con el zinc, el cual tiene la misma configuración electrónica que el cadmio y por lo tanto aparentemente actúan física y químicamente de manera similar (Thorp *et al.*, 1979; Giesy *et al.*, 1980). El zinc es un constituyente esencial de varias metaloenzimas y se encuentra ampliamente distribuido en los tejidos animales; cumple funciones estructurales, catalíticas y reguladoras, necesarias para el crecimiento celular, el desarrollo y la diferenciación en todas las especies. Es un constituyente integral de más de 200 enzimas como la anhidrasa carbónica; es un activador esencial de la carbopeptidasa pancreática y ocurre en las deshidrogenasa glutámica, láctica y alcohólica así como en las fosfatasa alcalinas (Prosser, 1991).

En los crustáceos acuáticos, el efecto de los metales pesados depende de un gran número de factores incluyendo el ciclo de vida, la historia térmica, el régimen ambiental y la presencia de otros tóxicos. Las variables como la temperatura (Vernberg *et al.*, 1974; Rosenberg y Costlow, 1976; White y Rainbow, 1984a), la salinidad y la concentración de calcio (Jonnalagadda y Prasada, 1993; Hansen *et al.*, 1992; Bjerregaard y Depledge, 1994; Magliette *et al.*, 1995)

modifican la dinámica química de los metales, su disponibilidad y por lo tanto su toxicidad. Al respecto, se menciona que las especies estuarinas son particularmente sensibles a la acción tóxica de los metales pesados debido a la interacción entre el estrés salino y el incremento en la biodisponibilidad de los iones metálicos en bajas salinidades (Hansen *et al.*, 1992; Rainbow *et al.*, 1993).

La tolerancia en los organismos acuáticos a los metales pesados, depende de la habilidad de regular la concentración interna de los iones metálicos, de acumular el metal excedente en formas no tóxicas y de eliminarlo por diversas vías. En los crustáceos, se han identificado diversos mecanismos de desintoxicación del cadmio y del zinc: el enlace a proteínas específicas fundamentalmente metalotioneínas; la compartimentalización y acumulación de los iones metálicos en lisosomas y la formación de precipitados insolubles como concreciones de calcio y magnesio y gránulos inertes de calcio y fosfato, los cuales son desechados vía heces y orina o acumulados en el hepatopáncreas (White y Rainbow 1984 a y b; Khan *et al.*, 1989; Bjerregaard, 1990; Roesijadi, 1992; Viarengo y Nott, 1993), así como la eliminación de los metales por la exuvia (Renfro *et al.*, 1975; Green *et al.*, 1976). Sin embargo, la capacidad para regular la concentración interna de los metales esenciales como el zinc y el cobre, es exclusiva de los crustáceos decápodos, la cual disminuye tanto al aumentar la concentración del metal como el tiempo de exposición a los metales (Rainbow y White, 1989; Ahsanullah y Williams, 1991).

La toxicidad del cadmio y del zinc se atribuye fundamentalmente a las perturbaciones producidas en las funciones bioquímicas. Entre estas se consideran las modificaciones en los enlaces de los grupos funcionales de los sistemas enzimáticos producto de la alta afinidad de los iones metálicos por los grupos imidazol, carboxilo, histidilo y fundamentalmente sulfidrido de las proteínas, con la consecuente alteración en la estructura de los componentes celulares y en última instancia, de la función celular (Dhavale *et al.*, 1988; Viarengo y Nott, 1993).

En los crustáceos acuáticos, el efecto tóxico de los metales pesados está relacionado con el deterioro estructural y funcional de las branquias, principal órgano blanco de los contaminantes

ambientales. Las branquias desempeñan un papel fundamental en el intercambio iónico y gaseoso, en el balance ácido-base, en la ecreción nitrogenada y en la regulación corporal de agua. La pérdida de la integridad funcional de los organismos por efecto de los iones metálicos, se relaciona con las alteraciones en los procesos respiratorios (Spicer y Weber, 1991) y en los mecanismos de osmoregulación (Pequeux, 1995). Tales alteraciones se asocian con la desorganización de los sistemas enzimáticos involucrados.

Al respecto, se ha reportado la inhibición de la $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPasa, enzima esencial para la regulación iónica y osmótica, en el cangrejo *Scylla serrata* (Dhavale *et al.*, 1988) por la intoxicación crónica con cadmio, en *Eriocheir sinensis* por la exposición subletal al Hg (Pequeux, 1995) y en *Carcinus maenas* por efecto del cobre (Hansen *et al.*, 1992). Esta inhibición provoca severas alteraciones en el balance iónico de los individuos y alteraciones en la presión osmótica. Asimismo, se mencionan cambios en la presión osmótica por efecto de niveles subletales de cadmio en el isópodo *Idotea neglecta* (Jones, 1975), en *Carcinus maenas* y *Hemigrapsus nudus* (Caldwell, 1974) y por el cobre en *C. maenas* (Thurberg *et al.*, 1973), lo cual se atribuye a alteraciones en la estructura branquial y en la permeabilidad y en los mecanismos de transporte de la branquia y por lo tanto en la función osmorreguladora de los organismos. En contraste, niveles subletales de zinc no modifican los electrolitos plasmáticos en *Crangon crangon* y *C. maenas* (Johnson, 1988) y no alteran la presión osmótica de *Gammarus duebeni* (Johnson y Jones, 1990), lo cual se asocia con la regulación corporal del metal.

Por otro lado, concentraciones subletales de cadmio producen cambios severos en el metabolismo respiratorio de *Carcinus maenas* y *Cancer magister* (Thurberg *et al.*, 1983; Depledge, 1984) así como en *Uca pugilator* (Verberg *et al.*, 1974), *Penaeus aztecus* y *P. setiferus* (Espina y Vanegas, 1996) y en *Leptomysis lingvura* (Gaudy *et al.*, 1991). El efecto tóxico sobre la nutrición y la excreción nitrogenada, también ha sido señalada en *Leptomysis lingvura* (Gaudy *et al.*, 1991) y en *Carcinus maenas* (Amiard *et al.*, 1982) por concentraciones subletales de cadmio; en *Pseudocalanus* sp. y *Calanus* sp. por el cobre y en *Gammarus pulex* por la intoxicación crónica al zinc (Maltby y Nylor, 1990). Bajos niveles de cadmio reducen el

crecimiento en *Uca pugilator* (Vernberg et al., 1974) en tanto que concentraciones subletales de zinc, alteran la reproducción en *Gammarus pulex* (Maltby y Nylor, 1990).

Frecuentemente el efecto subletal de los metales pesados ha sido evaluado por exposiciones aisladas a los contaminantes. En este sentido, es escasa la información referente a la acción conjunta de los iones metálicos en los organismos acuáticos y en particular en los crustáceos. Al respecto, se ha mencionado que el zinc actúa de manera antagónica al cadmio en anfípodos (Oadken et al., 1984) en tanto que en el camarón *Callinassa australiensis*, actúan sinérgicamente (Ahsanullah et al., 1981b; Negilski et al., 1981). En larvas y adultos de *Uca pugilator*, se señala el efecto sinérgico de concentraciones subletales de cadmio y mercurio (Vernberg et al. 1974). En contraste, la acción conjunta del cobre y del zinc no ejercen efecto tóxico en *Crangon crangon* y *Carcinus maenas* (Johnson, 1988). La interacción de los metales pesados ha sido estudiada en mayor grado en peces. Así, el zinc actúa sinérgicamente con detergentes en teleósteos (Brown et al., 1968). En la tilapia *Oreochromis niloticus*, la acción tóxica de las mezclas de zinc, cadmio y mercurio fue sinérgica (cuvien-Aralar y Aralar), en tanto que en *Oreochromis mossambicus* el efecto tóxico de la acción conjunta del cadmio y el zinc, se relaciona con la razón de cada metal en las mezclas más que con la suma de su efecto individual. (Pelgrom et al. 1994). Dado que en el medio natural los metales pesados ocurren en mezclas, los estudios que consideran la evaluación de la intoxicación crónica por la acción conjunta de los tóxicos ambientales proporcionan una mayor información que la evaluación aislada de cada contaminante.

La determinación del efecto subletal de los contaminantes aporta una mayor información sobre la alteración funcional que experimentan los organismos (Gaudy et al., 1981); sin embargo, la evaluación de respuestas fisiológicas individuales, aisladas, no siempre dan cuenta del deterioro de los organismos por el efecto estresante de los tóxicos ambientales. En este sentido, una medida global, indicadora de la adecuación de los organismos al ambiente es el campo de crecimiento (P), el cual se refiere a la energía potencial destinada al crecimiento somático y a la producción de gametos. La energía potencial de crecimiento o campo de crecimiento, es la suma

total de las respuestas de los organismos a las variables ambientales (Bayne *et al.*, 1976; Widdows y Johnson, 1988; Widdows *et al.*, 1990; Viarengo y Canesi, 1991).

En los crustáceos, la medición de la energía potencial de crecimiento requiere la determinación de varios procesos fisiológicos, tales como las tasa de alimentación, de respiración, de excreción y de muda, y su integración mediante la energética fisiológica (Logan y Epifanio, 1978; Dawirs, 1983; Kurmaly *et al.*, 1989). Cualquier alteración en alguna respuesta fisiológica por efecto de compuestos tóxicos, puede modificar el equilibrio energético de los organismos y en consecuencia alterar el crecimiento potencial de los especímenes. Dicha alteración puede tener efecto a largo plazo en la estabilidad de las poblaciones al modificarse el potencial de la especie en términos de crecimiento y reproducción (Viarengo y Canesi, 1991; De Kruijff, 1991; Rice, 1990).

Recientemente, se ha demostrado que el campo de crecimiento es un índice de condición de gran sensibilidad para evaluar los efectos que la contaminación marina tienen sobre la biota acuática. La disminución en el crecimiento potencial aún por efecto de bajas concentraciones de hidrocarburos aromáticos y metales pesados, se menciona en *Mytilus edulis* (Widdows *et al.*, 1990; Viarengo y Canesi, 1991) y por niveles subletales de zinc en *Gammarus pulex* (Maltby y Nylor, 1990).

Uno de los ecosistemas altamente impactados por el aporte antropogénico de contaminantes en el Golfo de México es la Sonda de Campeche. Esto se debe fundamentalmente a las actividades petroleras, agrícolas e industriales de la zona. En la Laguna de Terminos, adyacente a la Sonda de Campeche, se registran elevadas concentraciones de los metales pesados cadmio, zinc, cromo y plomo, así como de hidrocarburos derivados del petróleo (Botello *et al.*, 1992). Las concentraciones de los metales sobrepasan en muchos casos, los niveles de mínimo riesgo para la biota acuática (US EPA, 1979).

La captura de camarón en la Sonda de Campeche, es una de las actividades económicas de mayor importancia. La pesquería se sustenta fundamentalmente en las formas adultas de *Penaeus duorarum* (camarón rosado) y *Penaeus setiferus* (camarón blanco), este último muy apreciado por su talla. En la fase adulta, marina, *P. setiferus* está sujeto a una explotación de tipo artesanal e industrial, en tanto que en la Laguna de Términos, los juveniles son objeto de una pesca artesanal clandestina (Gracia, 1989). Por lo tanto, las poblaciones del camarón blanco experimentan por una parte la presión de sobrepesca y por otra, el incremento de la contaminación en su ambiente natural.

Los estudios referentes a la contaminación marina en la Laguna de Términos, principalmente por hidrocarburos, pesticidas y metales pesados, se han realizado desde hace más de una década (Botello y Villanueva, 1988). Con respecto a los metales pesados, la mayoría de las investigaciones abordan aspectos relacionados con su cuantificación en la columna de agua, en los sedimentos y con la bioacumulación en algunos bivalvos como *Crassostrea virginica* y en el pasto marino *Thalassia testudinum* (Rosas *et al.*, 1983; Botello y Villanueva, 1988; Paéz-Osuna *et al.*, 1987; Ponce-Velez y Botello, 1991; Villanueva y Botello, 1992; Vásquez, 1993).

Sin embargo, a la fecha se desconocen los efectos biológicos que los tóxicos ambientales puedan ejercer sobre la biota acuática de la Laguna de Términos y en particular en las poblaciones de los juveniles de *P. setiferus*, particularmente sensibles al efecto adverso de los metales pesados en el ambiente estuarino (Hansen *et al.*, 1992).

Así, el propósito del presente estudio fue determinar el efecto tóxico del cadmio y del zinc en los juveniles del camarón blanco *Penaeus setiferus* de la Laguna de Términos, Campeche. Con este fin se propusieron los siguientes objetivos particulares:

- a. Medir la concentración letal media (CL_{50-96 h}) del cadmio, del zinc y de las mezclas de los metales para los juveniles de *P. setiferus*.
- b. Evaluar las alteraciones producidas en el balance hidrosalino de los camarones por la exposición crónica a cada metal y a sus mezclas.

c. Cuantificar el efecto de la exposición crónica de estos contaminantes sobre las tasas fisiológicas que se integran en el balance energético.

d. Establecer la relación causa-efecto considerando la acumulación corporal de los metales pesados y las alteraciones biológicas producidas.

AREA DE ESTUDIO

La Laguna de Términos se localiza en la zona costera del sudeste del Golfo de México, en el Estado de Campeche, entre los 91° 15' y 91° 51' longitud Oeste y los 18° 27' y 18° 50' latitud Norte (Fig. 1). Esta laguna, se ubica en la base de la península de Yucatán y está bordeada por dos provincias geológicas: al Este, la Península de Yucatán, caracterizada por bajas precipitaciones, suelos calcáreos y poco drenaje superficial; al Oeste y al Sur, por las tierras bajas de Tabasco y los altos de Chiapas y Guatemala, caracterizada por altas precipitaciones y suelos fluviales (Yáñez-Arancibia *et al.*, 1988).

La laguna es alargada y somera, con un área aproximada de 2 500 km² y una profundidad promedio de 3.5 m. Este cuerpo lagunar se encuentra separado del Golfo de México por la Isla del Carmen, pero mantiene comunicación con el mar a través de la Boca de Puerto Real y del Carmen, ubicadas al E y al O de la isla, respectivamente (Yáñez-Arancibia *et al.*, 1988). Debido a la prevalencia de los vientos del Este, se presenta un flujo neto de agua de mar a la laguna, a través de la Boca de Puerto Real y un reflujó neto del agua lagunar al Golfo de México, por la Boca del Carmen. Este patrón de circulación del agua, determina fuertes gradientes semipermanentes en la salinidad, la turbidez, los nutrientes y el tipo de sedimentos (Phleger y Ayala-Castañares, 1971). La Laguna de Términos recibe aporte fluvial de tres ríos principalmente: Palizada, Chumpán y Candelaria. El mayor aporte de la descarga fluvial (> 50%) lo recibe la parte suroeste de la laguna (Gracia, 1989)

El clima de la región es del tipo Am (w) tropical húmedo (García, 1964) y se distinguen tres épocas climáticas: secas, de Febrero a Mayo; lluviosa, de Junio a Octubre y de Nortes, de Octubre a Febrero. La precipitación pluvial anual es en promedio de 1680 mm (Yáñez-Arancibia y Day, 1988). Las fluctuaciones de la salinidad del agua en la laguna, se relacionan directamente con el régimen de lluvias; en promedio, la salinidad mayor de 33.5 ‰ corresponde a la época de secas y la menor de 21.9‰ a la época de lluvias (Botello y Mandelli, 1978). En la laguna se presenta un gradiente de salinidad desde 35 ‰ en la Boca de Puerto Real hasta 2 ‰

en las zonas de influencia fluvial (Gracia y Soto, 1990). La temperatura del agua en la cuenca central de la laguna oscila anualmente entre los 27 y los 33°C; la temperatura mínima, de 24°C se registra en la época de Nortes y la máxima, de 32°C, en la época de secas (Yáñez-Arancibia y Day, 1988).

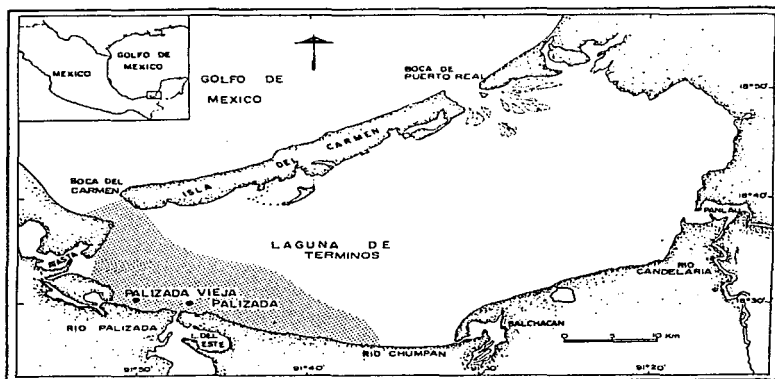


Fig. 1. Laguna de Términos. Se señala el área de mayor abundancia de *P. setiferus* (▨); Gracia y Soto, 1992) y los sitios de captura (o).

De acuerdo a los gradientes de salinidad, temperatura, tipo de sustrato, vegetación predominante, producción primaria, patrón de circulación y macrofauna ictiológica, se han descrito estructural y funcionalmente, cinco subsistemas en la Laguna de Términos: la Boca de Puerto Real, el litoral interior de la Isla del Carmen, la cuenca central, el sistema fluvio-lagunar y la Boca del Carmen (Yáñez-Arancibia y Day, 1988).

La vegetación en la laguna, se asocia con los patrones de circulación, de turbidez y de salinidad del agua, así como del sustrato. Las comunidades de pastos marinos están dominados por *Thalassia testudinum* y ocasionalmente se presentan *Halodule wrightii* y *Syringodium*

filiforme, las cuales se distribuyen fundamentalmente en el margen interno de la Isla del Carmen, en el delta de la Boca de Puerto Real y a lo largo de la zona litoral Este y Sureste de la Laguna (Moore y Wetzel, 1988). Casi toda la laguna se encuentra rodeada por manglares, entre los que destacan el mangle rojo *Rizophora mangle*, el mangle negro *Avicenia germinans* y el mangle blanco *Laguncularia racemosa*; eventualmente se presenta *Conocarpus erectus* (Yáñez-Arancibia *et al.*, 1988).

La Laguna de Términos es un sistema fluvio-lagunar de gran importancia económica y ecológica, debido a la gran diversidad de especies y de ambientes; a los recursos bióticos y pesqueros que sustenta; a las interacciones ecológicas entre la laguna y la Sonda de Campeche; al gran crecimiento industrial, petrolero y pesquero de la región así como al desarrollo urbano y agrícola que incide en la zona. Esta laguna, es habitat de numerosos grupos faunísticos de importancia comercial como son peces, camarones, ostiones, caracoles y jaibas, y cuya explotación favorece el desarrollo socioeconómico de la región (Yáñez-Arancibia, 1986).

Entre los crustáceos decápodos destacan por su abundancia local, los camarones pencidos, principalmente las formas juveniles de tres especies: el camarón rosado *Penaeus duorarum*, el camarón café *P. aztecus* y el camarón blanco *P. setiferus*. Este último es el más abundante y está sujeto a una pesca artesanal clandestina; su mayor concentración se reporta en la zona Suroeste de la Laguna de Términos particularmente durante la época fría, de Nortes (Fig. 1) (Gracia y Soto, 1990).

Una amplia información sobre los procesos geológicos de la Laguna de Términos es mencionada por Phleger y Ayala-Castañares (1971); Paez-Osuna *et al.* (1987), Botello y Mandelli (1978), Botello y Villanueva (1988), Ponce-Vélez y Botello (1991) y Vasquez *et al.* (1993) se refieren a la contaminación y a los procesos geoquímicos; Mancilla y Vargas (1980) a la hidrodinámica; Yáñez-Arancibia y Day (1988) y Raz-Guzmán (1993) a los aspectos ecológicos; García-Cubas (1981), Lara-Domínguez *et al.* (1981), Escobar y Soto (1989) y Gracia (1989) a los aspectos biológicos.

MATERIALES Y METODOS

A. Captura y Mantenimiento

Los juveniles del camarón blanco *Penaeus setiferus*, de 2.1 a 7.6 g de peso húmedo (PH, g), se capturaron al Sureste de la Laguna de Términos en las zonas cercanas a Palizada y Palizada Vieja (Fig. 1) durante la época fría y de Nortés; en este período se reporta la mayor abundancia de los juveniles de la especie (Gracia y Soto, 1990). La captura se realizó en horas de la mañana con una red de arrastre tipo "chango" de 1" de abertura de malla. La duración del arrastre fue de 5.5 min, tiempo que permitió la recuperación completa de los organismos del estrés ocasionado por tal procedimiento. Durante las capturas se midió la temperatura y el oxígeno disuelto del medio con un oxímetro YSI con sensor térmico (± 0.5 mg O₂/L; $\pm 0.5^{\circ}\text{C}$); la salinidad con un refractómetro (ATAGO; ± 0.5 ‰) y el pH con un sensor YSI (± 0.05 unidades).

Asimismo, se tomaron muestras de agua (2 L) y de organismos (N = 20) de la zona de captura, con el fin de cuantificar la concentración de cadmio y de zinc. Las muestras de agua se tomaron a 1.5 m de profundidad con una Botella Van-Dorn, se fijaron con ácido nítrico concentrado (5 ml) y se congelaron para su posterior análisis. Los camarones se pesaron (PH, g) y se congelaron para la posterior cuantificación de los metales pesados. La concentración de los metales en las muestras de organismo y de agua, se determinó mediante espectrofotometría de absorción atómica, de acuerdo a los procedimientos señalados por Paez-Osuna *et al.* (1988) y Ponce-Velez y Botello (1991). Los análisis se efectuaron en el Laboratorio de Contaminación Marina del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología y en el Laboratorio de Análisis Químico del Centro de Ecología, de la UNAM.

Con el fin de caracterizar la muestra de los juveniles utilizados en el presente estudio, se tomó una submuestra de la captura de 37 organismos a los cuales se les determinó el sexo y se les midió la longitud total (LT), la longitud patrón (LP) y la longitud del caparazón (LC₁ y LC₂) con un vernier (± 0.01 cm) (Fig. 2). Así mismo se midió el peso húmedo (PH, g) de los camarones en una balanza de plato (OHAUS; ± 0.01 g); posteriormente se deshidrataron a 60°C hasta peso constante en una estufa (BLUE M) y este peso seco (PS, g) se midió en una balanza analítica (SAUTER, GmbH D-7470). La determinación de los especímenes, así como el estadio de desarrollo se efectuó utilizando las claves de Williams (1984).

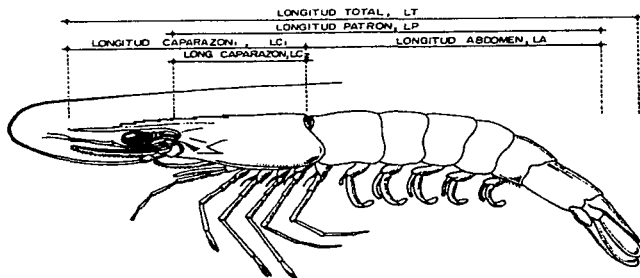


Fig. 2. Morfometría de los juveniles de *Penaeus setiferus*.

Los camarones capturados se transportaron al laboratorio en contenedores plásticos de 100 L, con agua del sitio y con aireación constante. En el laboratorio, los animales se colocaron en acuarios de fibra de vidrio de 500 L con filtro biológico, en una densidad de 120 organismos/acuario y con agua de la laguna previamente filtrada a través de conchuela de mar fina (7 mm diam.), arena de mar (2 mm diam.) y finalmente por filtro de diatomeas (80 μ).

Durante el período de mantenimiento, la salinidad y la temperatura fueron de 15 ± 1 ‰ y $23 \pm 1^\circ\text{C}$, respectivamente, similares a los valores promedio registrados en la zona de captura. El oxígeno disuelto y el pH se mantuvieron en 6.5 ± 0.5 mg O_2/L y 7.8 ± 0.2 unidades. El fotoperíodo se mantuvo en 12/12 h luz/oscuridad. Los camarones permanecieron en estas condiciones por cinco días antes de someterlos a experimentación, con el fin de contrarrestar los efectos de la captura, la manipulación y el transporte. Durante este período se les proporcionó diariamente alimento balanceado (Camaronina; 35% de proteína) al 10% de su peso corporal.

En todos los experimentos, se emplearon organismos en estado de intermuda; el estadio del ciclo de muda se determinó mediante el examen de los urópodos (Wassenberg y Hill, 1984).

En los juveniles de *P. setiferus*, las pruebas de toxicidad tanto agudas como crónicas se llevaron a cabo a $23 \pm 1^\circ\text{C}$ y a 11 ± 1 ‰ de salinidad, correspondiente al punto isosmótico de los especímenes.

B. Determinación del Punto Isosmótico

Para la determinación del punto isosmótico se utilizaron acuarios de vidrio de 20 L con agua de la laguna a salinidades de 5, 10, 15, 20 y 25 ± 1 ‰. En cada acuario se colocaron 10 organismos procedentes de los acuarios de mantenimiento, donde permanecieron por 72 h. Al respecto, se conoce que los juveniles de *P. setiferus* se aclimatan en dicho lapso a los cambios bruscos tanto de salinidad, como de temperatura (Sánchez, 1979). Los animales no se alimentaron en este período ni durante 12 h previas a la exposición. Las características del agua fueron 6.9 ± 0.5 mg O_2/L , $23 \pm 1^\circ\text{C}$ y pH de 8.3 ± 0.1 .

Al finalizar el período de 72 h, se extrajo la hemolinfa de cada organismo por punción de la membrana tóraco-abdominal con una jeringa Hamilton heparinizada (Heparina amónica,

SIGMA; 0.75 mg/l) de 100 μ l. Previo a la obtención de la muestra, la zona se secó cuidadosamente para evitar contaminación con el agua del medio. La presión osmótica se determinó en un Osmómetro (Osmette; \pm 0.5 mOsm). Debido a que la mínima muestra requerida para el análisis era de 200 μ l y el volumen de hemolinfa/ camarón fue en promedio de 100 μ l, cada muestra se colocó en viales que contenían 10 μ l de heparina amónica y se diluyó con 100 μ l de agua desionizada; inmediatamente la muestra se agitó vigorosamente y en seguida se efectuaron las lecturas de la presión osmótica. La dilución anterior se efectuó también en las muestras empleadas para evaluar la presión osmótica del agua del medio, así como en muestras de NaCl de concentración similar a las salinidades experimentales. Todo el procedimiento se efectuó en frío. Los resultados de la presión osmótica de las muestras (mOsm), se corrigieron por volumen y por la adición de la heparina-amónica; cabe señalar que ésta no modificó la presión osmótica de las muestras.

El punto isosmótico de los juveniles de *P. setiferus* se calculó gráficamente de la intersección de la presión osmótica de la hemolinfa de los camarones de cada salinidad experimental, con la línea de isosmoticidad. La relación entre la osmolaridad y la salinidad correspondiente al punto isosmótico se obtuvo mediante la regresión entre ambas variables (Zar, 1984).

Al término del experimento, los camarones utilizados se pesaron (PH, g) y se deshidrataron en una estufa Blue-M a 60°C hasta peso constante (PS, g).

C. Pruebas de Toxicidad Aguda: CL 50 - 96 h

Los juveniles de *P. setiferus* empleados en las pruebas de toxicidad aguda del cadmio, del zinc y de la mezcla de estos, se mantuvieron durante 5 días a la salinidad correspondiente al punto isosmótico de los especímenes (11 ± 1 ‰). La salinidad en los acuarios de mantenimiento se diluyó 2 ‰/día con agua desclorada, hasta alcanzar la salinidad deseada. Durante este período

las condiciones fisicoquímicas del agua y el régimen de alimentación de los camarones, fueron similares a los de la etapa de mantenimiento.

La determinación de la concentración letal media (CL₅₀ - 96 h) de los metales se efectuó mediante pruebas de toxicidad estáticas de 96 h, acorde al procedimiento señalado por UNEP (1986). Las concentraciones de cadmio y zinc empleadas en los bioensayos, se prepararon a partir de una solución patrón de cloruro de cadmio (CdCl₂ · 2½ H₂O, Spectrum; 79% de pureza) y de cloruro de zinc (ZnCl₂, Baker; 97% de pureza) respectivamente. Para cada metal, dichas pruebas se efectuaron por duplicado con cinco concentraciones experimentales y un testigo (sin contaminante): 0, 0.43, 0.76, 2.58, 4.46, 4.80 y 5.80 mg/L de cadmio y 0, 1.40, 8.50, 11.60, 28.40, 62.50 y 105.10 mg/L de zinc. Se utilizaron acuarios de vidrio de 20 L y en cada uno se colocaron 10 organismos en estado de intermuda, 12 h previas a la adición de cada contaminante. Los camarones empleados se mantuvieron en ayuno 12 h antes de su colocación en los acuarios así como durante las pruebas. Diariamente se efectuaron registros de temperatura, salinidad, pH y oxígeno disuelto, los cuales se mantuvieron en 23 ± 1°C, 11 ± 1‰, 8.3 ± 0.1 pH y 6.9 ± 0.5 mg O₂/L.

Las observaciones de la condición de los camarones y de la sobrevivencia se efectuaron a las 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 24, 36, 48, 72 y 96 h de exposición a cada contaminante. La muerte de los organismos se estableció de acuerdo al criterio de la UNEP (1987). Los camarones que murieron durante el transcurso de los experimentos y los que sobrevivieron a la exposición a los metales, se pesaron (PH, g) y se deshidrataron en una estufa Blue-M hasta peso constante (PS, g).

Una vez conocida la CL₅₀ - 96 h del cadmio y del zinc, se establecieron las concentraciones (mg/L) de los metales en las mezclas (M). Se utilizaron dos razones de toxicidad (RT): 1:1 y 2.3:1. Las razones de toxicidad de las mezclas se calcularon de la fórmula (Lloyd, 1961; Sprague y Ramsay, 1965):

$$RT = ([Cd]_M / CL_{50} Cd) : ([Zn]_M / CL_{50} Zn)$$

Para cada razón de toxicidad se evaluaron por duplicado cinco unidades de toxicidad (UT) y un testigo (Tabla 1). Las unidades de toxicidad se calcularon de la fórmula propuesta por los autores mencionados:

$$UT = ([Cd]_M / CL_{50} Cd) + ([Zn]_M / CL_{50} Zn)$$

Tabla 1. Concentraciones de cadmio (mg/L) y zinc (mg/L) medidas en la mezcla de metales con diferentes unidades de toxicidad (UT) en dos razones de toxicidad (RT), a la que se expusieron los juveniles de *P. setiferus* durante 96 h.

RT 1:1			RT 2.3:1		
UT	Cd mg/L	Zn mg/L	UT	Cd mg/L	Zn mg/L
0.10	0.05	2.07	0.07	0.05	1.05
0.15	0.07	3.25	0.20	0.14	2.68
0.28	0.14	6.15	0.26	0.18	3.38
0.38	0.19	8.31	0.41	0.28	5.39
0.55	0.27	12.06	0.59	0.41	7.85

Los organismos se expusieron por 96 h a las concentraciones equivalentes a cada unidad de toxicidad (UT) calculada, en ambas razones de toxicidad (RT). El desarrollo de estos experimentos agudos se realizó de manera similar a la descrita previamente para conocer la concentración letal media (mg/L) de cada metal. Asimismo, las concentraciones reales de los metales en cada condición experimental se midieron en muestras de 250 ml de agua, tomadas al inicio y término de cada prueba.

D. Pruebas de Toxicidad Crónica

Una vez conocida la concentración letal media para cada metal (CL₅₀ - 96 h) y las UT en las que se produjo el 50% de la mortalidad de los camarones (UT₅₀ - 96 h) expuestos a las mezclas de los metales en dos RT, fue posible seleccionar las concentraciones subletales a ser utilizadas en los experimentos crónicos. En todos los casos las concentraciones elegidas como subletales, produjeron en los camarones en las pruebas de toxicidad aguda (96 h), una mortalidad menor del 1%.

Los juveniles de *P. setiferus* se expusieron por 21 días a 0.05 y 0.14 mg Cd/L y a 0.16 y 0.26 mg Zn/L. En las mezclas, los organismos se expusieron por 15 días a soluciones que contenían los metales en 0.025 y 0.04 UT en una RT de 1:1 y a 0.02 y 0.035 UT en una RT de 2.3:1. Las concentraciones correspondientes de cada metal en dichas mezclas se presentan en la Tabla 2.

Tabla 2. Concentraciones de cadmio (mg/L) y de zinc (mg/L) medidos en la mezcla de los metales con diferentes unidades de toxicidad (UT) en dos razones de toxicidad (RT), a la que se expusieron los juveniles de *P. setiferus* durante 15 días.

RT 1:1			RT 2.3:1		
UT	Cd mg/L	Zn mg/L	UT	Cd mg/L	Zn mg/L
0.025	0.012	0.548	0.020	0.014	0.263
0.040	0.020	0.877	0.035	0.031	0.597

En cada condición experimental se emplearon 20 juveniles en estado de intermuda, los cuales se pesaron previamente (PH, g) y se colocaron en acuarios de vidrio de 40 L. Los camarones se mantuvieron en ayuno 12 h antes y después del traslado a dichos acuarios. Posteriormente se

adicionaron los contaminantes. Las características del agua y el fotoperíodo fueron similares al de las pruebas de toxicidad aguda.

En el transcurso de los experimentos crónicos, los organismos se alimentaron diariamente con dieta balanceada (Camaronina, 35% de proteína) al 4% de su peso corporal. El alimento se suministró en horas de la tarde y cuatro horas después se retiró el alimento remanente; las heces producidas se retiraron diariamente. Así mismo, durante el transcurso de los experimentos se colectaron las exuvias de los camarones.

Cada dos días se efectuaron recambios de agua del 50% del volumen de los acuarios y se renovaron las soluciones respectivas de los metales; en los días intermedios, se efectuó filtrado mecánico de un volumen similar de agua. Para verificar las concentraciones reales de los metales en el agua, se analizaron muestras de 250 ml al inicio, a los siete días y al finalizar el período de exposición, como se mencionó anteriormente.

Con el fin de determinar el efecto producido en los juveniles de *P. setiferus* por la exposición crónica de 21 días al cadmio y al zinc y de 15 días a la mezcla de los metales, se evaluaron diversas respuestas fisiológicas.

1. Balance Hidrosalino

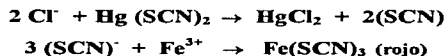
Una vez finalizado el período de exposición crónica al cadmio, al zinc y a la mezcla de los metales, se evaluaron diversas respuestas relacionadas con el proceso de osmoregulación en los camarones, como fueron la presión osmótica del medio interno, la concentración de cloruro plasmático y el balance de agua de los juveniles de *P. setiferus*. Asimismo, se evaluó la actividad de las ATPasas branquiales, como un indicador del intercambio activo del Na^+ y K^+ en el epitelio branquial de los camarones.

Presión osmótica

La presión osmótica (mOsm) de la hemolinfa de los juveniles de *P. setiferus*, se midió en una submuestra de 5 a 11 organismos de cada condición experimental. El procedimiento seguido fue similar al señalado previamente para la obtención del punto isosmótico de la especie.

Cloruro plasmático

Para determinar la concentración de cloruro (Cl^- ; mMoles/L) de la hemolinfa de los camarones, se emplearon 10 organismos por cada condición experimental. Las muestras de la hemolinfa (10 μl) se obtuvieron por punción de la membrana tóraco-abdominal empleando una jeringa Hamilton de 10 μl , previamente heparinizada (Heparina amónica; SIGMA). La concentración de cloruro (Cl^- ; mMoles/L), se determinó mediante la técnica de diagnóstico clínico SIGMA (461-3; St. Louis Mis. USA). Esta técnica colorimétrica se basa en la cantidad de tiocianato desplazado por el Cl^- desde el tiocianato de mercurio. El tiocianato liberado forma un complejo rojo con los iones férricos, donde la coloración es proporcional a la concentración de Cl^- de la muestra.



Las lecturas de las muestras se efectuaron en un espectrofotómetro (Spectronic 88, Bausch and Lomb) a 460 nm.

ATP asas branquiales

La actividad enzimática de la $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPasa branquial se determinó de acuerdo al método descrito por Tentes y Stratakis (1991). Todo el procedimiento se efectuó en frío. La actividad

enzimática se evaluó en una submuestra de 10 organismos de cada condición experimental; los organismos se sacrificaron y se separó el cefalotorax del abdomen. Las branquias se removieron y se enjuagaron en solución fría de glucosa (0.25 M) y EDTA (6 mM). Se seleccionaron los filamentos de las branquias posteriores, ya que es el principal sitio de intercambio iónico en los crustáceos (Prosser, 1991; Pequeux, 1995). Los filamentos branquiales se enjuagaron nuevamente, se secaron en papel filtro y se pesaron (PH, mg). Para cada ensayo se empleó el número de organismos necesarios para obtener muestras de branquias de pesos similares (0.05 g); se obtuvieron de 2 a 7 muestras por cada condición experimental.

Dichas muestras se homogenizaron en frío, en 10 ml de una solución de glucosa 0.25 M, EDTA 6 mM, imidazol 30 mM, DTT 0.1 mM, PMSF 10 mM y pH 6.8. El homogenado se mantuvo a -20°C durante un máximo de cinco días antes de su análisis. Cabe señalar que en estudios previos, durante este periodo y en estas condiciones, no se detectaron modificaciones en la actividad enzimática.

Posteriormente, se descongeló el homogenado y se evaluó la actividad enzimática, por duplicado, en 100 µl de homogenado con 25 a 50 µg de proteína. La actividad enzimática de la Na⁺ - K⁺ ATPasa branquial se determinó a partir de la diferencia entre la concentración de fosfato inorgánico liberado del ATP, en ensayos realizados en medios de incubación en ausencia (ATPasa Total) y en presencia de Ouabaina (Mg ATPasa) (Tabla 3). En cada caso la incubación se efectuó a 30°C por 15 min. El volumen final de cada muestra (por tubo) fue de 300 µl. Una vez finalizado el periodo de incubación, se detuvo la reacción adicionando 0.9 ml de TCA al 8%. Diez minutos después, las muestras se centrifugaron a 2000 rpm durante 10 min.

La cantidad de fosfato libre en el sobredanante se midió por el método de Ames (1966). Se tomaron 50 µl de cada muestra y se agregaron 250 µl de agua desionizada y 0.7 ml del Reactivo de Ames. Inmediatamente, cada muestra se agitó y se incubó a 45°C durante 20 min.

Las lecturas de la absorbancia, tanto de las muestras como de la dilución estándar de fosfato (0.5 $\mu\text{g Pi / ml}$), se efectuaron a 820 nm.

Tabla 3. Medios de incubación empleados para evaluar la actividad enzimática de la $\text{N}^+ - \text{K}^+$ ATPasa branquial de los juveniles de *P. setiferus*.

Composición	Medio con K^+ sin Ouabaína	Medio sin K^+ con Ouabaína
KCL	30 mM	---
ATP	5 mM	5 mM
Ouabaína	----	1 mM
NaCL	100 mM	130 mM
MgCl_2	10 mM	10 mM
Imidazol	20 mM	20 mM
pH	7.2	7.2

Las proteínas totales se cuantificaron en muestras de 100 μl de homogenado disuélido, mediante el método de Lowry *et al* (1951). Todos los ensayos se efectuaron por duplicado. Las lecturas de la absorbancia de las muestras experimentales y de soluciones estándar de concentración conocida (mg proteína/ml), se efectuaron en un espectrofotómetro (Spectronic 21, Bausch and Lomb) a 600 nm. Los estándares de proteína se prepararon con albúmina-sérica-ovina.

La actividad enzimática específica se calculó en $\mu\text{Moles Pi h}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína. Todos los reactivos utilizados en los ensayos fueron grado analítico (SIGMA).

Contenido corporal de agua

El contenido de agua de los juveniles de *P. setiferus* de cada condición experimental, se calculó de la diferencia entre el peso húmedo (PH, g) y el peso seco esperado (PS, g) obtenido de la

regresión lineal: $PS = a + b PH + e$; los parámetros de la ecuación a y b se obtuvieron del ajuste del modelo mediante la técnica de mínimos cuadrados y la bondad de ajuste, mediante el análisis de residuos (Zar, 1984). El porcentaje de humedad se calculó de la ecuación:

$$H_2O, \% = [(PH - PS) / PH] 100$$

2. Balance Energético.

Al término de la exposición crónica al cadmio, al zinc y a la mezcla de los metales, se evaluó el balance energético de los juveniles de *P. setiferus*. El balance energético de los organismos de cada condición experimental, se calculó del modelo $I = P + R + N + H$ (Ivlev, 1939; Winberg, 1960) a partir del cual se determinó el campo de crecimiento de los organismos (P) por la diferencia entre la energía contenida en el alimento ingerido (I) y la energía utilizada en la respiración (R), la pérdida en la excreción nitrogenada (N) y la producción de heces (H); se consideró además la energía perdida en la exuvia (E) por los camarones (Logan y Epifanio, 1978):

$$P = I - (R + N + E + H)$$

La obtención de los valores correspondientes a las tasas fisiológicas ($\text{cal d}^{-1} \text{g}^{-1} \text{PS}$) se detalla a continuación.

Ingestión (I)

La tasa de ingestión se calculó de la diferencia entre el alimento suministrado diariamente a los camarones y el alimento remanente en los acuarios después de 4 h, obtenido por medio de un sifón. El agua se filtró a través de una red de plancton (500μ de abertura de malla) de peso conocido. Las redes con el alimento recolectado se secaron hasta peso constante en una estufa

a 60°C (Blue-M) y por diferencia con el peso seco de las redes, se cuantificó el peso seco del alimento (PSa, g). La tasa de ingestión se expresó en mg PSa d⁻¹ g⁻¹ PS. Estos valores se corrigieron por la dilución diaria del alimento en dos acuarios control, sin organismo y sin contaminantes. Los resultados se transformaron en valores calóricos y se expresaron en cal d⁻¹ g⁻¹ PS.

Para la obtención del valor calórico tanto del alimento suministrado como del alimento remanente (cal g⁻¹ PS) se empleó un mínimo de cinco muestras de cada condición experimental. Los análisis se efectuaron en el Laboratorio de Nutrición Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM.

Asimilación (A)

La fracción de la energía del alimento asimilado (A) por los camarones de cada condición experimental, se calculó indirectamente del producto de la tasa de ingestión (I; mg PSa d⁻¹ g⁻¹ PS), de la eficiencia de asimilación (U, %) y del contenido calórico del alimento suministrado a los organismos (ca; cal mg⁻¹ PS) acorde a Condrey *et al.* (1972):

$$A = (I) (U) (ca)$$

La eficiencia de asimilación se calculó empleando la ecuación propuesta por Conover (1966) y modificada por Condrey *et al.* (1972):

$$U = [(I - H) / (1 - H) I] 100$$

donde I = PSLC / PS del alimento suministrado y H = PSLC / PS de las heces producidas. PSLC se refiere al peso seco libre de cenizas obtenido al incinerar muestras de peso seco conocido a 500°C acorde a APHA (1985).

Durante el transcurso de los experimentos crónicos, las heces se recolectaron diariamente de manera similar a la descrita para el alimento remanente; se lavaron con agua destilada y se obtuvo su peso seco (PS, g). De cada condición experimental se analizó el PSLC tanto del alimento suministrado a los camarones como de las heces producidas, en cinco muestras de 1 g PS cada una,

A fin de evitar una subestimación en la eficiencia de asimilación debido a la probable asimilación de las cenizas del alimento ingerido, se empleó la corrección propuesta por Condrey *et al.* (1972):

$$U' = (U / 100) + [Au / Af (I(1 - H) / H(1 - I))] \times 100$$

donde U' es la eficiencia de asimilación corregida y Au y Af corresponden a la cantidad de cenizas en el alimento ingerido y en las heces, respectivamente; Au / Af es la fracción de las cenizas asimiladas.

Respiración (R)

La tasa respiratoria de los camarones se determinó a través del metabolismo de rutina, para lo cual se evaluó el consumo de oxígeno en un sistema respirométrico de flujo semi-continuo (Díaz *et al.*, 1989; Vanegas, 1992) (Fig. 3).

Los camarones procedentes de cada condición experimental ($n=15$), se colocaron en cámaras de 500 ml; una de ellas, sin organismo, se consideró como control. En este sistema, los camarones permanecieron tres horas antes de las mediciones con el fin de aminorar los efectos del estrés producidos por el traslado. El agua de las cámaras se mantuvo en condiciones similares a los de cada experimento crónico. Los organismos utilizados se encontraban en estado de intermuda y con ayuno previo de 24 horas.

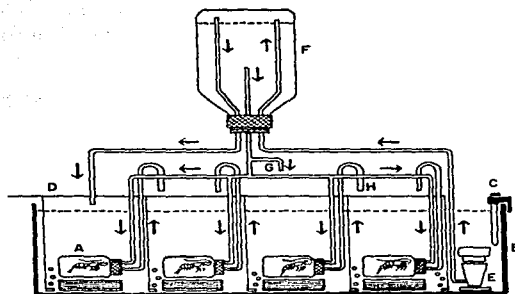


Fig. 3. Sistema de flujo para determinar el consumo de oxígeno y la excreción nitrogenada de los juveniles de *P. setiferus*. A. Cámaras; B. Acuario termorregulado; C. Termostato; D. Aire; E. Bomba sumergible; F. Reservorio; G. Toma de muestras a la entrada de las cámaras; H. Toma de muestras a la salida de las cámaras (Díaz *et al.*, 1989).

Con el fin de conocer la tasa del consumo de oxígeno de los organismos, se tomó una muestra inicial del agua de cada cámara, se suspendió el flujo y se selló inmediatamente durante 30 min; posteriormente, las cámaras se abrieron y se tomó una muestra final de agua y se restableció el flujo durante 90 min. En seguida se repitió el procedimiento. La concentración de oxígeno de las muestras de agua se midió con un oxímetro (YSI-54 ARC; ± 0.05 mg O₂/L). El consumo de oxígeno (mg O₂ h⁻¹) se calculó por la diferencia entre la concentración inicial y final del oxígeno disuelto de las muestras y en relación al tiempo de cerrado de las mismas. Estos valores se corrigieron por los obtenidos en la cámara control, sin organismo y se expresaron en mg h⁻¹ g⁻¹ PS. Los resultados se transformaron en unidades de energía (cal d⁻¹ g⁻¹ PS) utilizando el coeficiente oxalórico de 3.32 cal/mg O₂ (Elliot y Davison, 1975).

Excreción Nitrogenada (N)

La excreción nitrogenada (N-NH₄⁺, mg/L) se evaluó en los mismos organismos, en el mismo dispositivo y de manera similar a la empleada para cuantificar el consumo de oxígeno, pero en

muestras de agua independientes (Fig. 3). La concentración de nitrógeno amoniacal de cada muestra (N-NH_4^+ , mg/L), se determinó mediante la técnica de Azul de Indofenol modificada por Gutman y Bergmeyer (1974); las lecturas se efectuaron en un espectrofotómetro (Spectronic 88; Bausch and Lomb) a 640 nm.

La cantidad de nitrógeno amoniacal excretado por los camarones (N-NH_4^+ , mg h^{-1}), se calculó por diferencia entre las concentraciones final e inicial de las muestras de agua de cada cámara y en relación al tiempo que éstas permanecieron cerradas. Estos valores se corrigieron a su vez por los obtenidos en la cámara control, sin organismo y se expresaron en $\text{mg h}^{-1} \text{g}^{-1} \text{PS}$; posteriormente se transformaron en sus correspondientes valores calóricos ($\text{cal d}^{-1} \text{g}^{-1} \text{PS}$) utilizando el coeficiente nitrocalórico de 5.94 cal/mg N-NH_4^+ (Elliot y Davison, 1975).

Todas las mediciones del consumo de oxígeno y de la excreción nitrogenada de los camarones, se efectuaron entre las 7 y las 10 h. Este periodo se seleccionó debido a que al evaluar previamente en un ciclo de 24 h el consumo de oxígeno y la excreción nitrogenada de los juveniles de *P. setiferus* del grupo testigo, no se encontraron diferencias significativas en las tasas fisiológicas y a que en este lapso se obtuvieron en el ciclo diurno, los valores promedio de las respuestas evaluadas.

Exuvia (E)

En el transcurso del experimento crónico las exuvias (e) producidas se cuantificaron y se determinó el periodo de intermuda (días) de los especímenes, lo cual permitió calcular la tasa de muda (e d^{-1}) de los camarones de cada condición experimental. Las exuvias recolectadas se lavaron con agua destilada y se obtuvo su peso seco (PSe, g).

La cantidad de energía perdida en la exuvia (E; cal d⁻¹ g⁻¹ PS) se obtuvo a partir de la relación del peso seco de la exuvia (PSe, g) y de los organismos (PS, g), de la tasa de muda (e d⁻¹) y del contenido calórico de las exuvias (cal g⁻¹ PSe), acorde a Logan y Epifanio (1978):

$$E = (g \text{ PSe } g^{-1} \text{ PS}) (\text{cal } g^{-1} \text{ PSe}) (e \text{ d}^{-1})$$

Los análisis calóricos se efectuaron en un mínimo de 10 exuvias por condición experimental, en el Laboratorio de Nutrición Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM.

Campo de Crecimiento (P)

Con el fin de calcular el campo de crecimiento (P) de los juveniles de *P. setiferus* expuestos por 21 días al cadmio y al zinc y por 15 días a las mezclas de los metales, los valores correspondientes a las tasas fisiológicas de los camarones de cada condición experimental, se integraron en la ecuación del balance energético, mencionada anteriormente:

$$P = A - (R + N + E)$$

donde A es la energía contenida en el alimento asimilado, R es la energía utilizada en la respiración y N y E se refieren a la energía perdida en la excreción nitrogenada y la exuvia, respectivamente. Los valores de las tasas se expresaron en cal d⁻¹ g⁻¹ PS.

3. Bioacumulación

Una vez finalizado el período de exposición crónica a los contaminantes, se evaluó la acumulación del cadmio y del zinc en los juveniles de *P. setiferus*. Por cada condición

experimental se analizaron un mínimo de 5 a 8 organismos y de 8 a 16 exuvias de las recolectadas en el transcurso de los experimentos. Tanto los organismos como las exuvias, se lavaron con agua destilada y se secaron hasta peso constante (PS, g). La concentración de los metales en las muestras ($\mu\text{g g}^{-1}$ PS) se determinó mediante espectrofotometría de absorción atómica y de acuerdo al procedimiento propuesto por Goldberg *et al.* (1983) modificado por Paéz-Osuna *et al.* (1988). Los análisis se efectuaron en el Laboratorio de Análisis Químico, del Centro de Ecología de la UNAM.

E. Análisis Estadístico

Los resultados de la mortalidad obtenidos en las pruebas de toxicidad, se analizaron de acuerdo al procedimiento propuesto por la EPA (Environmental Protection Agency; U.S. EPA, 1989). La determinación de la concentración letal media (CL₅₀ - 48, 72 y 96 h) de cada metal y de las unidades de toxicidad (UT) de las mezclas de los metales a dos razones de toxicidad (RT) en las cuales se obtuvo el 50% de mortalidad (UT₅₀ - 48, 72 y 96 h), se estimaron por el modelo log - probit mediante el Programa de Computo DORES (Ramírez, 1989).

Para el análisis de los resultados obtenidos tanto de los pesos de los organismos utilizados en las pruebas agudas y crónicas como de las respuestas evaluadas en los experimentos crónicos, se empleó el Diagrama de Cajas en Paralelo del Análisis Exploratorio de Datos (Tukey, 1977). Para cada grupo de datos se obtuvieron los elementos de dichas cajas; el intervalo de confianza (IC) de la mediana (M) se calculó de la siguiente fórmula, donde n es el número de datos y ΔH es la amplitud de la caja:

$$\text{IC} = M \pm 1.58 (\Delta H / \sqrt{n})$$

Para establecer en cada una de las respuestas evaluadas las diferencias significativas entre los grupos analizados, se compararon los intervalos de confianza de las medianas ($\alpha = 0.05$); tales diferencias se corroboraron empleando las pruebas no paramétricas de Kruskal-Wallis y

Newman-Keuls (Zar, 1984). En dicho análisis se empleó el programa de cómputo STATGRAPHICS (Stat. Graph. Syst. V-2.1; 1985-1986).

RESULTADOS

A. Morfometría

Los juveniles de *P. setiferus* de 1.61 a 7.70 g de peso húmedo, se recolectaron en la zona sur de la Laguna de Términos (Fig. 1) a una profundidad promedio de 1.9 m; la salinidad, temperatura, oxígeno disuelto y pH del agua del medio fluctuaron durante las capturas de 7 a 14 ‰, de 23 a 25 °C, de 7.4 a 8.5 mg O₂/L y el pH de 7.8 a 8.6.

La caracterización de la población de los camarones empleados en este estudio se efectuó a partir de una submuestra de 37 organismos. El peso húmedo (PH, g) y el peso seco (PS, g) de los especímenes fueron 3.33 ± 0.43 g y 0.89 ± 0.16 g, respectivamente; la longitud total (LT), patrón (LP), del caparazón (LC1 y LC2) fueron de 8.57 ± 0.31 , 5.84 ± 0.2 , 3.11 ± 0.1 y 1.69 ± 0.05 cm, respectivamente. Los diversos parámetros medidos en los juveniles de *P. setiferus*, se relacionaron de la siguiente manera:

$$LP = 1.27 + 0.53 LT ; R^2 = 0.88$$

$$LC1 = 0.59 + 0.29 LT ; R^2 = 0.91$$

$$LC2 = -0.07 + 0.58 LC1 ; R^2 = 0.95$$

$$LT = 6.28 + 0.66 PH ; R^2 = 0.87$$

$$PS = -0.02 + 0.27 PH ; R^2 = 0.97$$

Todos los modelos fueron significativos ($P < 0.01$). El contenido relativo de agua calculado para los especímenes fue de 74.04 ± 0.12 %.

La proporción de sexos de los camarones fue de 49-51% hembras-machos. En el presente trabajo no se efectuó distinción de sexos dado que en estudios previos se ha determinado que en juveniles de camarones pencidos, las respuestas fisiológicas que despliegan, son independientes del sexo ($P < 0.05$; Sánchez, 1979).

B. Determinación del Punto Isosmótico

Durante el período de mantenimiento de los camarones a las diferentes salinidades por 72 h, la sobrevivencia fue del 100%. El peso húmedo de los organismos varió de 4.10 ± 0.26 a 5.65 ± 0.65 g y el peso seco de 0.98 ± 0.07 a 1.37 ± 0.33 g; estas diferencias no fueron significativas ($P > 0.05$).

Los valores de la presión osmótica de la hemolinfa (Hm, mOsm) de los organismos expuestos a las diferentes salinidades se señalan en la Tabla 4; asimismo, se incluyen los valores de la presión osmótica del medio externo y de soluciones de cloruro de sodio, de concentraciones similares a cada salinidad experimental. Las relaciones entre la presión osmótica de la hemolinfa (Hm, mOsm) y la concentración del medio externo, expresada tanto en salinidad (S, ‰) como en g NaCl/L, se establecieron mediante las regresiones lineales:

$$PO, \text{ mOsm} = 11.51 + 28.49 \text{ ‰ S}; \quad R^2 = 1.0$$

$$PO, \text{ mOsm} = 6.48 + 32.44 \text{ g/L NaCl}; \quad R^2 = 0.99$$

En ambos casos, los modelos fueron significativos ($P < 0.01$).

La presión osmótica del medio interno de los camarones no se modificó significativamente al variar la salinidad del medio ($P < 0.05$), lo cual pone en evidencia el comportamiento osmorregulador de la especie en el intervalo de las salinidades evaluadas (Tabla 4; Fig. 4). En el medio diluido (5 y 10 ‰) los organismos presentaron una hemolinfa hiperosmótica con respecto al medio, e hiposmótica en salinidades más elevadas de 15, 20 y 25 ‰. El punto isosmótico (PI) se calculó gráficamente en 310 mOsm (Fig. 4) y utilizando los modelos mencionados, fue posible expresar el valor del PI como 10.5 ‰ o como 9.4 g NaCl/L.

Tabla 4. Presión osmótica de la hemolinfa (Hm, mOsm) de los juveniles de *P. setiferus* expuestos a diferentes salinidades (medio externo; ME; ‰) y de concentraciones conocidas de NaCl (g/L). Valores medianos e intervalo de confianza de la mediana ($\alpha = 0.05$). n = número de muestras analizadas.

S ‰	n	Hm mOsm	n	ME mOsm	NaCl g/L	n	NaCl mOsm
5	6	410 ± 40 ^a	7	163 ± 7 ^a	5	10	168 ± 6 ^a
10	10	303 ± 57 ^a	7	287 ± 11 ^b	10	12	327 ± 9 ^b
15	8	359 ± 41 ^a	5	432 ± 6 ^c	15	12	488 ± 10 ^c
20	6	398 ± 104 ^a	5	574 ± 16 ^d	20	11	670 ± 17 ^d
25	10	395 ± 18 ^a	6	724 ± 19 ^e	25	11	792 ± 15 ^e

Letras diferentes en sentido vertical denotan diferencias significativas ($P < 0.05$).

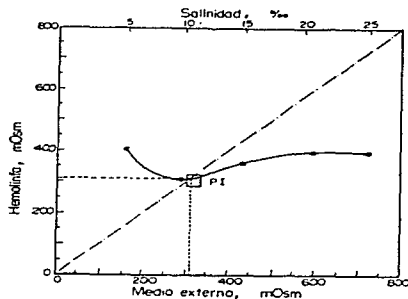


Fig. 4. Relación entre la concentración osmótica de la hemolinfa (mOsm) de los juveniles de *P. setiferus* y el medio externo (mOsm; ‰). Cada punto representa la mediana de la presión osmótica de 6-10 camarones. El valor del punto isosmótico (PI) es de 310 mOsm.

C. Pruebas de Toxicidad Aguda: CL50-96 h

El peso húmedo de los juveniles de *P. setiferus* utilizados en las pruebas de toxicidad aguda del cadmio, del zinc y de las mezclas de los metales, varió de 3.31 ± 0.74 a 4.69 ± 0.58 g y el peso seco de 0.64 ± 0.17 a 0.98 ± 0.10 g; estas variaciones no fueron significativas ($P > 0.05$).

En la determinación de la concentración letal media de cada metal (CL50-96 h, mg/L) y de la unidad de toxicidad (UT) de las mezclas de cadmio y zinc a dos razones de toxicidad (RT) donde se produjo la muerte del 50% de los especímenes (UT50-96h), se utilizó el modelo log-probit (Ramírez, 1989). En todos los casos, el modelo fue significativo ($P < 0.05$) y explicó entre el 78 y 98% de la variabilidad observada en la mortalidad de los camarones; la bondad de ajuste de los modelos se estableció mediante el análisis de X^2 y no se detectaron diferencias significativas entre los valores esperados y observados de la mortalidad ($P > 0.05$). Los datos obtenidos y utilizados para generar en cada caso el modelo se presentan en el Anexo 1a-1d, en el cual se observa que la mortalidad aumenta a medida que se incrementan tanto el tiempo de exposición como la concentración de los contaminantes, aislados o en mezclas.

La concentración letal media (CL50-96 h) obtenida para el cadmio (0.99 ± 0.20 mg/L) y para el zinc (43.87 ± 21.36 mg/L) indicó que la toxicidad del cadmio fue 44 veces mayor que el zinc (Tabla 5a). La CL50 de cada metal disminuyó a medida que el tiempo de exposición se incrementó de 48 a 96 h, si bien en cada caso estas diferencias no fueron significativas ($P > 0.05$).

Al exponer los camarones a las mezclas de los metales, el cadmio fue 40 veces más tóxico que el zinc en la mezcla cuya UT50-96 h fue 0.31 y los metales se encontraron en una RT 1:1 (Tabla 5b); en cambio, al aumentar la razón de toxicidad a 2.3:1, la toxicidad del cadmio se redujo a la mitad. Cabe destacar que la UT50-96 h en dicha situación, descendió en un 10%. Los resultados obtenidos indican que los metales en mezclas, incrementaron considerablemente su toxicidad al compararlos con su efecto individual. Si bien la exposición de 96 h al zinc fue

Tabla 5a. Valores de la concentración letal media (CL50; $\bar{X} \pm ES$) de cadmio y de zinc (mg/L) para *P. setiferus* en diferentes lapsos de exposición (h).

Tiempo, h	48	72	96
Cd, mg/L	1.35 \pm 0.21	0.99 \pm 0.20	0.99 \pm 0.24
Zn, mg/L	78.86 \pm 35.77	51.64 \pm 17.94	43.87 \pm 21.36

Tabla 5b. Valores de las unidades de toxicidad (UT50; $\bar{X} \pm ES$) de las mezclas de cadmio y zinc (mg/L) en dos razones de toxicidad (RT) que produjeron el 50% de mortalidad en *P. setiferus*, en diferentes periodos de exposición (h).

Tiempo, h	RT	UT	Cd ²⁺ , mg/L	Zn ²⁺ , mg/L
48	1:1	0.78 \pm 0.34	0.39 \pm 0.17	16.15 \pm 7.04
	2.3:1	0.55 \pm 0.14	0.39 \pm 0.10	8.25 \pm 2.10
72	1:1	0.40 \pm 0.07	0.20 \pm 0.04	8.28 \pm 2.07
	2.3:1	0.34 \pm 0.05	0.24 \pm 0.04	5.10 \pm 0.75
96	1:1	0.31 \pm 0.04	0.16 \pm 0.02	6.42 \pm 0.83
	2.3:1	0.28 \pm 0.03	0.20 \pm 0.02	4.20 \pm 0.45

relativamente tóxica, en presencia de niveles tan bajos como 0.16 (RT 1:1) y 0.20 mg/L de cadmio (RT 2.3:1), su toxicidad se incrementó entre 7 y 10 veces. A su vez, el efecto tóxico del cadmio aumentó de 4 a 6 veces a medida que se elevó la RT del metal en la mezcla. Es posible afirmar que al elevarse la RT sólo en un 10%, la toxicidad del zinc se elevó en un 35% en tanto que el cadmio se incrementó en un 20%.

El efecto tóxico de los metales en mezclas fue mayor a medida que el tiempo de exposición se incrementó de 48 a 96 h, aunque se observaron diferencias relacionadas con la razón de toxicidad (Tabla 5b). En la RT 1:1, la UT50 se redujo 60% ($P < 0.05$) al aumentar el periodo de exposición de 48 a 96 h, mientras que en la RT 2.3:1, la UT50 disminuyó ($P < 0.05$) entre 48 y 72 h (38%) como entre 48 y 96 h (49%).

Cabe señalar que las concentraciones del cadmio y zinc en las mezclas en las cuales se obtuvo el 50% de mortalidad de los especímenes (UT50-96h), fueron menores que la CL20-96h obtenida en las pruebas de toxicidad de cada metal (Tabla 5a y 5b). Los resultados obtenidos demuestran la complejidad del efecto tóxico de la interacción de los metales, donde obviamente se presentó un fenómeno de sinergismo, lo cual también fue evidente a las 48 y 72 h de exposición a los contaminantes. Asimismo, la toxicidad de los metales dependió de la razón de los tóxicos en las mezclas.

D. Pruebas de Toxicidad Crónica

1. Mortalidad

En los experimentos crónicos, la evaluación de la mortalidad resultante de la exposición a los metales pesados, se dificultó por el hecho que al mudar los organismos fueron presa de sus congéneres. En la Tabla 6 se presentan los valores del porcentaje de mortalidad total, la asociada al proceso de muda y la atribuida a la acción tóxica de los metales pesados.

Tabla 6. Mortalidad (%) de los juveniles de *P. setiferus* expuestos por 21 días al cadmio (mg/L) y al zinc (mg/L) y por 15 días a la mezcla de los metales en diferentes unidades de toxicidad (UT) correspondientes a dos razones de toxicidad (RT). La concentración de los metales (mg/L) en estas mezclas, se muestran en paréntesis. Mortalidad total (MT), por muda (Mm) y por efecto del metal (Mmet). Se incluye la mortalidad observada (M) por la exposición aguda (96 h) a los metales

Condición	MT, %	Mm, %	Mmet, %	M(96h),%
Testigo	25.5	17.5	8.2	0.0
Cadmio, 0.05	30.0	15.0	15.0	1.0
0.14	55.5	45.0	10.5	5.0
Zinc, 0.16	35.0	20.0	15.0	0.5
0.26	20.0	5.0	15.0	1.0
RT 1:1 (Cd ; Zn)				
UT 0.025 (0.012 ; 0.548)	30.0	15.0	15.0	0.30
0.04 (0.020 ; 0.877)	35.0	17.5	17.5	1.0
RT 2.3:1 (Cd ; Zn)				
UT 0.02 (0.014 ; 0.263)	37.5	10.0	27.5	0.30
0.035 (0.031 ; 0.597)	45.0	20.0	25.0	1.0

En el grupo testigo, se observó una mortalidad del 25.5% de la cual el 17.5% se asoció al proceso de muda; si bien el 8% restante se atribuyó a otras causas no determinadas, este valor es menor al 10% señalado por US EPA (1989) como la máxima mortalidad aceptable en experimentos de toxicidad para el grupo control.

En todas las condiciones experimentales, el aumento en el tiempo de exposición a los metales de cuatro días (96 h) a 21 días incrementó la mortalidad de los camarones. Así, es posible observar que en la menor concentración de 0.05 mg/L, el cadmio provocó un aumento en la mortalidad de 15 veces con respecto al valor esperado del 1%, al extenderse el tiempo de exposición de 4 a 21 días. Al incrementarse la concentración de cadmio a 0.14 mg/L, donde la mortalidad esperada a los cuatro días de exposición fue del 5%, la observada fue de 10.5% con un incremento del doble; sin embargo, la mortalidad asociada al efecto tóxico del cadmio fue 30% menor que en la concentración más baja. Esto se atribuye más que al efecto del metal, a un error en la estimación de la mortalidad provocada por la muda (Tabla 6).

El efecto a largo plazo del zinc fue notorio. Tanto en 0.16 como en 0.26 mg/L, la mortalidad fue 30 y 15 veces mayor, respectivamente, al aumentar el tiempo de exposición de 4 a 21 días (Tabla 6). Aunque en la exposición crónica al zinc la mortalidad por efecto del metal fue del 15 % tanto en bajas como en altas concentraciones, la disminución en la mortalidad asociada a la muda en 0.26 mg/L fue evidente. Lo anterior se atribuye a la reducción en la movilidad de los camarones en esta concentración, lo que probablemente protegió a los camarones del canibalismo durante el período de muda.

Por otra parte, es posible observar que las concentraciones de 0.05 mg/L de cadmio y de 0.26 mg/L de zinc, en las que se obtuvo una mortalidad esperada del 1% en los experimentos agudos, al incrementarse el tiempo de exposición a 21 días el aumento en la mortalidad fue similar (15 veces mayor) por ambos metales. Los resultados demuestran que en exposiciones individuales, el cadmio es mucho más tóxico para los juveniles de *P. setiferus* que el zinc, ya

que la misma mortalidad (15 %) se observó en concentraciones 52 % mayores de zinc que de cadmio (0.05 mg Cd/L y 0.26 mg Zn/L).

En los camarones expuestos a la mezcla de los metales en RT 1:1, la mortalidad fue 50 y 17.5 veces mayor con respecto a la esperada (0.3 y 1%) al aumentar el período de exposición de 4 a 15 días. Sin embargo, la mortalidad observada fue similar a la de los camarones expuestos de manera aislada a cada metal. El efecto de la interacción de los metales sobre la mortalidad de los especímenes fue notorio al aumentar la RT de los metales en la mezcla a 2.3:1. Al extenderse el tiempo de exposición de 4 a 15 días, la mortalidad en los camarones expuestos a 0.02 y 0.035 UT fue 92 y 25 veces mayor; en los experimentos agudos en dichas UT la mortalidad esperada fue de 0.1 y 1 %, respectivamente, similar a la de los grupos expuestos en RT 1:1 de los metales (Tabla 6). Estos resultados reflejan la interacción sinérgica del cadmio y del zinc en mezclas; de igual manera, resaltan la complejidad de tal interacción.

En la mezcla de los metales en una RT de 1:1, aún en la mayor UT de 0.04 donde la concentración de zinc fue 3.4 veces mayor a la que aisladamente produjo el 15% de mortalidad (0.26 mg/L), en presencia de 0.020 mg Cd/L la mortalidad fue similar, de 17.5 %. Sin embargo, al aumentar la RT de la mezcla a 2.3:1, el cadmio potenció la toxicidad del zinc. Lo anterior fue evidente en 0.02 UT, donde la concentración de zinc fue similar a la que aisladamente produjo un 15 % de mortalidad (0.26 mg/L), pero en presencia de 0.014 mg Cd/L, la mortalidad aumentó a 27.5 %. Por lo tanto, los resultados sugieren que el efecto tóxico de la acción conjunta del cadmio y el zinc está a su vez relacionado con la razón de los metales en las mezclas.

2. Balance Hidrosalino

El efecto tóxico de la exposición crónica al cadmio, al zinc y a sus mezclas en el balance hidrosalino de los juveniles de *P. setiferus*, se determinó a través de la evaluación de la presión

osmótica (mOsm) de la hemolinfa, los niveles de cloruro plasmático (mM/L), la actividad enzimática de las ATPasas en branquia (mMoles Pi h⁻¹ mg⁻¹ proteína) y el balance hídrico (% H₂O) de los especímenes. Los resultados obtenidos se describen a continuación.

Presión Osmótica

En los juveniles de *P. setiferus* del grupo testigo mantenidos durante 21 días a 23 ± 1°C y en 11 ± 1 ‰ S, mantuvieron su hemolinfa isosmótica (348 ± 41 mOsm) con respecto al medio externo (348 ± 41 mOsm) (Tabla 7; Fig. 5). Asimismo, la presión osmótica del medio interno de los camarones fue similar (P > 0.05) al obtenido previamente en la determinación del punto isomótico de los especímenes (310 mOsm) y correspondiente a 10.5 ‰ de salinidad del medio externo (Fig. 4).

Al exponer los camarones durante tres semanas al cadmio, la presión osmótica del medio interno de los camarones no fue modificada (P > 0.05) por el metal (Tabla 7; Fig. 5A). Sin embargo, la exposición a la mayor concentración de zinc (0.26 mg/L) redujo en un 32 % (P < 0.05) la osmolaridad de la hemolinfa de los organismos (Tabla 7; Fig. 5B).

En los camarones expuestos por dos semanas a las mezclas de los metales en RT de 1:1 y 0.040 UT, la presión osmótica de la hemolinfa aumentó 24 % (P < 0.05) con respecto al grupo testigo (Tabla 7; Fig. 5C). Cuando los organismos se expusieron a la mezcla en RT de 2.3:1, ésta se incrementó (P < 0.05) de manera similar, en un 22% (Tabla 7; Fig. 5D). En cada RT de los metales en la mezcla no se observaron diferencias significativas (P > 0.05) en la presión osmótica de los los grupos expuestos a las diferentes UT.

La disminución observada en la presión osmótica por efecto del zinc y el incremento producido por la interacción con el cadmio, permite suponer que el efecto tóxico del metal difiere cuando la exposición es de forma aislada que cuando ocurre en mezclas con el cadmio. Asimismo, cabe

Tabla 7. Presión osmótica (PO; mOsm) de la hemolinfa de los juveniles de *P. setiferus* expuestos durante 21 días a diferentes concentraciones de cadmio y de zinc (mg /L) y durante 15 días a la mezcla de estos en diferentes unidades de toxicidad (UT) correspondientes a dos razones de toxicidad (RT). Valores medianos e intervalo de confianza de la mediana ($\alpha = 0.05$). La concentración de los metales (mg/L) en las mezclas, se encuentran en paréntesis. n = número de organismos analizados.

Condición	PO, mOsm	n
Testigo	348 ± 41 ^a	11
Cadmio, 0.05	377 ± 72 ^a	10
0.14	336 ± 60 ^a	9
Zinc, 0.16	324 ± 12 ^a	5
0.26	235 ± 13 ^b	6
RT 1:1 (Cd ; Zn)		
UT 0.025 (0.012 ; 0.548)	443 ± 46 ^{ab}	6
0.040 (0.020 ; 0.877)	455 ± 9 ^b	6
RT 2.3:1 (Cd ; Zn)		
UT 0.020 (0.014 ; 0.263)	463 ± 81 ^{ab}	6
0.035 (0.031 ; 0.597)	446 ± 25 ^b	8

Letras diferentes en cada condición experimental denotan diferencias significativas respecto al grupo testigo ($P < 0.05$).

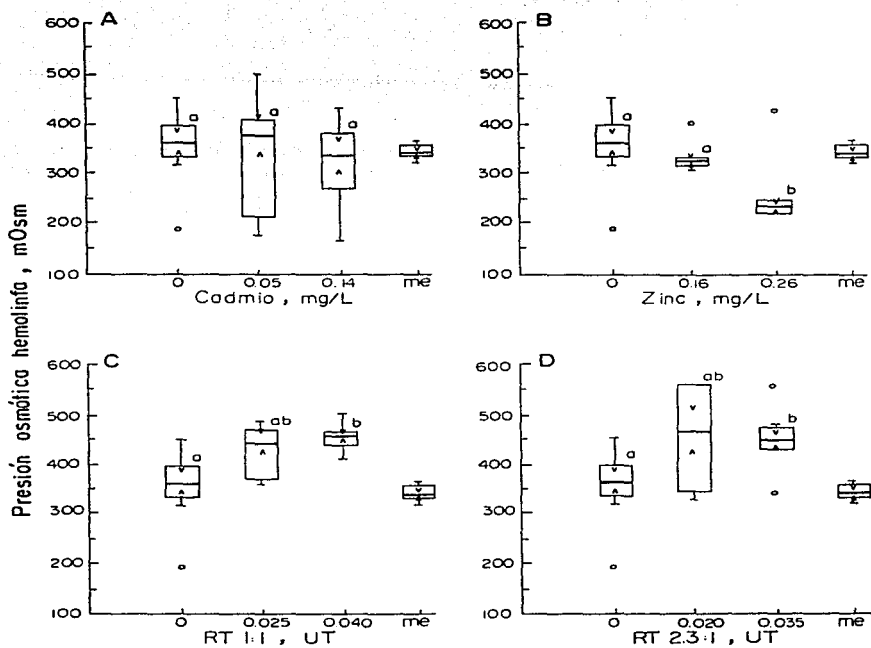


Fig. 5. Diagrama de cajas en paralelo de la presión osmótica de la hemolinfa de los juveniles de *P. setiferus* (PO; mOsm), expuestos durante 21 días a diferentes concentraciones (mg/L) de cadmio (A) y de zinc (B) y durante 15 días a diferentes unidades de toxicidad (UT) de la mezcla de los metales en dos razones de toxicidad (RT) 1:1 (C) y 2.3:1(D). Letras diferentes denotan diferencias significativas ($P < 0.05$). Se incluye la presión osmótica del medio externo (me) de los organismos correspondiente a 11 ‰ S.

recordar que en los organismos del grupo testigo la presión osmótica del medio interno corresponde al punto isosmótico de los camarones. Por lo tanto, los resultados obtenidos sugieren que tanto en las mayores concentraciones de zinc (0.26 mg/L) como en las mayores UT de ambas RT de las mezclas de los metales, se encuentran alterados los mecanismos responsables de la regulación del medio interno de los camarones.

Cloruro Plasmático

Las concentraciones de cloruro plasmático (mM/L) en los juveniles de *P. setiferus* de los diferentes grupos experimentales se señalan en la Tabla 8; se incluye además, la concentración de cloruro del medio externo de los organismos. Así, es posible observar que en los especímenes del grupo testigo aclimatados durante 21 días a $23 \pm 1^\circ\text{C}$ y $11 \pm 1\%$ S, los niveles de cloruro en la hemolinfa fueron 28% mayores que la del medio. Cabe señalar que en los organismos eurihalinos como los camarones peneidos, el cloruro plasmático es usualmente hiperiónico con respecto al medio externo aún en condiciones de isosmoticidad de la hemolinfa (Venkataramiah, 1974; Pequeux, 1995). Este comportamiento se observó en la mayoría de los grupos experimentales, siendo un 40% más elevadas que el medio en los camarones expuestos tanto a 0.05 como a 0.14 mg Cd/L y 20 a 23% en los expuestos a las mezclas en 0.04 UT en RT 1:1 y en 0.02 UT en RT 2.3:1. En cambio, en los camarones expuestos a 0.26 mg Zn/L y a las mezclas en 0.025 UT en RT 1:1, el cloruro de la hemolinfa disminuyó en un 33 y 24% ($P < 0.05$), respectivamente. El nivel de cloruro plasmático permaneció similar al del medio externo ($P > 0.05$) en la menor concentración de zinc (0.16 mg/L) y en la mayor UT (0.035) de los metales en la mezcla en RT 2.3:1.

Con respecto al grupo control, en los camarones expuestos por 21 días al cadmio, el metal no modificó las concentraciones del cloruro plasmático (Tabla 8; Fig. 6A). Sin embargo, la exposición crónica al zinc, redujo las concentraciones del cloruro en la hemolinfa de los camarones a medida que se incrementó la concentración del metal en el medio (Tabla 8; Fig.

Tabla 8. Concentración de cloruro (mMoles/L) en la hemolinfa de juveniles de *P. setiferus* expuestos durante 21 días a diferentes concentraciones de cadmio y de zinc (mg/L) y durante 15 días a la mezcla de los metales en diferentes unidades de toxicidad (UT) correspondientes a dos razones de toxicidad (RT). Valores medianos e intervalo de confianza de la mediana ($\alpha = 0.05$). La concentración de los metales (mg/L) en las mezclas, se encuentran en paréntesis. n = número de muestras analizadas. m.e.= medio externo.

Condición	Cl, mMoles/L	n
Testigo	228.02 \pm 16.72 ^a	14
Cadmio, 0.05	270.97 \pm 17.3 ^a	7
0.14	270.97 \pm 45.59 ^a	5
Zinc, 0.16	170.97 \pm 6.84 ^b	5
0.26	109.68 \pm 36.04 ^{ab}	8
RT 1:1 (Cd ; Zn)		
UT 0.025 (0.012 ; 0.548)	124.24 \pm 25.69 ^b	5
0.040 (0.020 ; 0.877)	210.77 \pm 18.16 ^{ab}	14
RT 2.3:1 (Cd ; Zn)		
UT 0.020 (0.014 ; 0.263)	203.85 \pm 11.17 ^{ab}	8
0.035 (0.031 ; 0.597)	161.11 \pm 23.44 ^b	12
Medio externo (11‰ S)	163.10 \pm 10.0 ^b	10

Letras diferentes en cada condición experimental denotan diferencias significativas respecto al grupo testigo ($P < 0.05$).

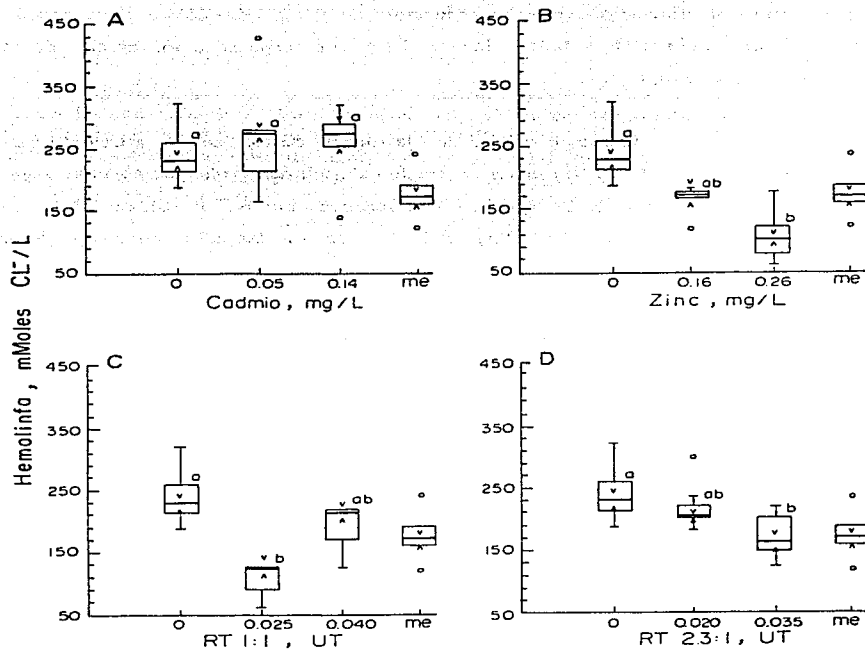


Fig. 6. Diagrama de cajas en paralelo de la concentración de cloruro en la hemolinfa de los juveniles de *P. setiferus* (mMoles/L), expuestos durante 21 días a diferentes concentraciones (mg/L) de cadmio (A) y de zinc (B) y durante 15 días a diferentes unidades de toxicidad (UT) de la mezcla de los metales en dos razones de toxicidad (RT) 1:1 (C) y 2.3:1(D). Letras diferentes denotan diferencias significativas ($P < 0.05$). Se incluye la concentración de cloruro del medio externo (me) de los organismos correspondiente a 11 % S.

6B); en 0.16 mg/L de zinc se observó una reducción ($P > 0.05$) del 25% y al incrementarse a 0.26 mg/L, la disminución ($P < 0.05$) fue del 52% con respecto a los niveles de cloruro plasmático del grupo testigo.

La exposición de los especímenes por 15 días a la mezcla de los metales a una RT de 1:1 y 0.025 UT redujo 46% ($P < 0.05$) la concentración del cloruro plasmático con respecto al grupo testigo (Tabla 8; Fig. 6C). Al exponer los camarones a una RT mayor, de 2.3:1, en 0.035 UT se observó una disminución ($P < 0.05$) del 29% en los niveles del cloruro de la hemolinfa de los camarones (Tabla 8; Fig. 6D).

Los resultados obtenidos sugieren que los mecanismos de acción tóxica del cadmio y del zinc en el balance hidrosalino de los camarones difieren cuando la exposición al metal es aislada que cuando ocurren en mezclas.

ATPasas branquiales

En los juveniles de *P. setiferus* del grupo control, la actividad enzimática de la $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPasa branquial fue elevada lo cual sugiere que aún en condiciones de isosmoticidad la enzima participa activamente en el transporte de los iones Na^+ y K^+ (Tabla 9).

La exposición de los camarones por 21 días al cadmio y al zinc, no modificó significativamente ($P > 0.05$) la actividad enzimática de la ATPasa total, la $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPasa y la Mg ATPasa ($\mu\text{Moles Pi h}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{proteína}$) de la branquia de los juveniles de *P. setiferus* (Tabla 9; Figs. 7A y B). Al comparar el porcentaje de actividad enzimática de la $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPasa y de la Mg ATPasa en relación a la actividad enzimática total de la ATPasa branquial, resaltan ciertas tendencias. En todos los grupos experimentales, fue posible observar que la actividad de la $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPasa contribuyó en mayor proporción a la actividad de la ATPasa total en branquia que la Mg ATPasa. En los camarones del grupo testigo, la actividad de la $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPasa y de la Mg

Tabla 9. Actividad de ATPasa total, Na⁺-K⁺ ATPasa y Mg ATPasa (μMoles Pi h⁻¹ mg⁻¹ proteína) de la branquia de juveniles de *P. setiferus* expuestos durante 21 días a diferentes concentraciones de cadmio y de zinc (mg/L) y durante 15 días a la mezcla de los metales en diferentes unidades de toxicidad (UT) correspondientes a dos razones de toxicidad (RT). Valores medianos e intervalo de confianza de la mediana (α = 0.05). La concentración de los metales (mg/L) en las mezclas, se encuentran en paréntesis. n = número de muestras analizadas.

Condición	n	ATPasa Total	Na ⁺ -K ⁺ ATPasa	Mg ATPasa
Testigo	6	12.72 ± 1.68 ^a	10.36 ± 0.81 ^a	2.52 ± 0.87 ^a
Cd ²⁺ , 0.05 0.14	3	13.21 ± 1.24 ^a	10.99 ± 0.54 ^a	2.48 ± 0.81 ^a
	7	11.68 ± 4.08 ^a	9.16 ± 3.79 ^a	2.52 ± 0.28 ^a
Zn ²⁺ , 0.16 0.26	7	12.34 ± 1.40 ^a	11.35 ± 1.17 ^a	1.55 ± 0.99 ^a
	2	12.65 ± 1.51 ^a	10.38 ± 1.04 ^a	2.27 ± 0.27 ^a
RT 1:1 (Cd ; Zn)				
UT 0.025 (0.012 ; 0.548)	5	13.30 ± 2.24 ^a	9.33 ± 1.67 ^b	4.35 ± 1.12 ^b
0.040 (0.020 ; 0.877)	6	13.30 ± 0.84 ^a	9.24 ± 0.96 ^b	3.77 ± 0.35 ^b
RT 2.3:1 (Cd ; Zn)				
UT 0.020 (0.014 ; 0.263)	6	13.42 ± 1.01 ^a	11.51 ± 3.83 ^a	1.25 ± 0.86 ^a
0.035 (0.031 ; 0.597)	6	10.96 ± 1.74 ^a	7.47 ± 1.84 ^b	3.50 ± 0.29 ^b

Letras diferentes en cada condición experimental denotan diferencias significativas respecto al grupo testigo (P < 0.05).

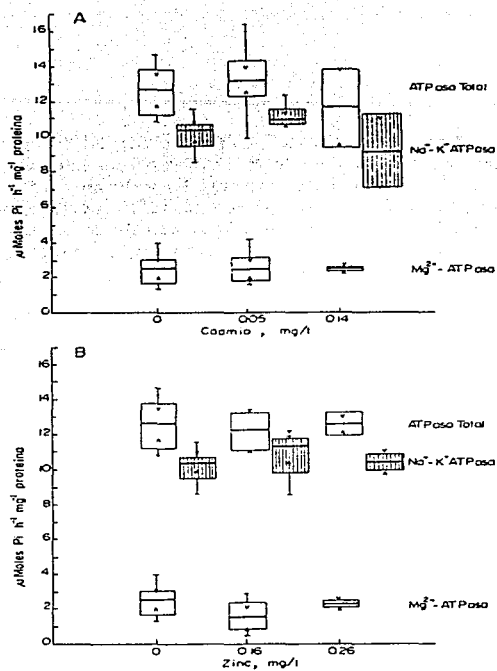


Fig. 7. Diagrama de cajas en paralelo de la actividad de la $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPasa ($\mu\text{Moles Pi h}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{proteina}$) de la branquia de los juveniles de *P. setiferus*, expuestos durante 21 días a diferentes concentraciones (mg/L) de cadmio (A) y de zinc (B).

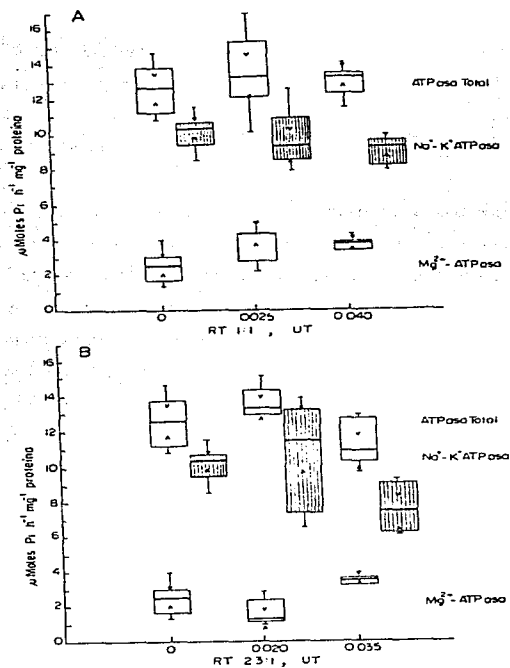


Fig. 8. Diagrama de cajas en paralelo de la actividad de la $\text{Na}^+ - \text{K}^+ \text{ATPase}$ ($\mu\text{Moles Pi h}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{proteina}$) de la branquia de los juveniles de *P. setiferus*, expuestos durante 15 días a diferentes unidades de toxicidad (UT) de la mezcla de los metales en dos razones de toxicidad (RT) 1:1 (A) y 2.3:1(B).

ATPasa correspondieron al 81 y al 20 % de la actividad total de la ATPasa. Este comportamiento se mantuvo en los camarones expuestos a las diferentes concentraciones de cadmio y de zinc, en los cuales la $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPasa contribuyó con el 78 al 92 % y la Mg ATPasa con el 13 al 22 % a la actividad total de la ATPasa branquial.

En los organismos expuestos a la mezcla de los metales en ambas RT (1:1 y 2.3:1), las ATPasas totales no fueron diferentes de las del grupo testigo ($P > 0.05$) en las diferentes UT. Sin embargo, se observaron diferencias significativas ($P < 0.05$) en la actividad de la $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPasa la cual fue inhibida por la mezcla de los metales en tanto la actividad de la Mg ATPasa se incrementó ($P < 0.05$) (Tabla 9; Figs. 8A y B). De tal manera, la contribución de la $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPasa a la actividad enzimática total disminuyó hasta un 68-70 % mientras que la de Mg ATPasa aumentó hasta un 32-30 %. La excepción a este comportamiento se observó en los camarones expuestos a 0.020 UT en una RT de 2.3:1, donde si bien la actividad de las enzimas fue similar al grupo testigo ($P > 0.05$), la participación de la Mg ATPasa en la actividad enzimática total disminuyó en un 9 % (Tabla 9; Fig. 8B).

Por lo tanto, los resultados obtenidos indican una activa participación de la enzimas en el mantenimiento del balance hidrosalino de los camarones, el cual es alterado por la acción conjunta de los metales. De tal manera, el incremento de la presión osmótica de los organismos expuestos a las mezclas de cadmio y zinc puede ser consecuencia del deterioro de la actividad enzimática de la $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPasa con el consecuente desbalance iónico y osmótico.

Contenido Corporal de Agua

El contenido corporal de agua se calculó a partir de la diferencia del peso húmedo (PH, g) y el peso seco esperado (PS, g) de los camarones, obtenido de la regresión lineal $\text{PS} = a + b\text{PH} + e$. Los parámetros y estimadores de estas regresiones lineales en los diferentes grupos

Tabla 10. Pesos húmedo (PH, g), seco (PS, g) y contenido relativo de agua (H₂O, %) de los juveniles de *P. setiferus* expuestos por 21 días al cadmio y al zinc (mg/L) y por 15 días a la mezcla de los metales en diferentes unidades de toxicidad (UT) correspondientes a dos razones de toxicidad (RT). Valores medianos e intervalo de confianza de la mediana ($\alpha = 0.05$). n = número de organismos.

Condición	UT	n	PH, g	PS, g	H ₂ O, %
Testigo		29	4.16 ± 0.49 ^a	0.87 ± 0.09 ^a	79.04 ± 0.72 ^a
Cadmio, 0.05		22	3.50 ± 0.50 ^a	0.80 ± 0.20 ^a	77.37 ± 0.36 ^b
	0.14	13	3.89 ± 0.74 ^a	0.92 ± 0.14 ^a	77.01 ± 0.25 ^b
Zinc, 0.16		23	2.96 ± 0.64 ^a	0.63 ± 0.16 ^a	78.22 ± 0.63 ^a
	0.26	16	3.29 ± 0.38 ^a	0.74 ± 0.09 ^a	77.91 ± 0.64 ^a
RT 1:1 (Cd ; Zn)					
UT 0.025 (0.012 ; 0.548)		14	3.58 ± 0.67 ^a	0.84 ± 0.15 ^a	76.48 ± 0.26 ^b
0.040 (0.020 ; 0.877)		16	3.43 ± 0.62 ^a	0.79 ± 0.17 ^a	77.65 ± 0.13 ^{ab}
RT 2.3:1 (Cd ; Zn)					
UT 0.020 (0.014 ; 0.263)		19	4.33 ± 0.78 ^a	1.05 ± 0.21 ^a	77.43 ± 0.27 ^b
0.035 (0.031 ; 0.597)		24	3.24 ± 0.16 ^a	0.76 ± 0.16 ^a	77.88 ± 0.15 ^b

Letras diferentes en cada condición experimental denotan diferencias significativas respecto al grupo testigo ($P < 0.05$).

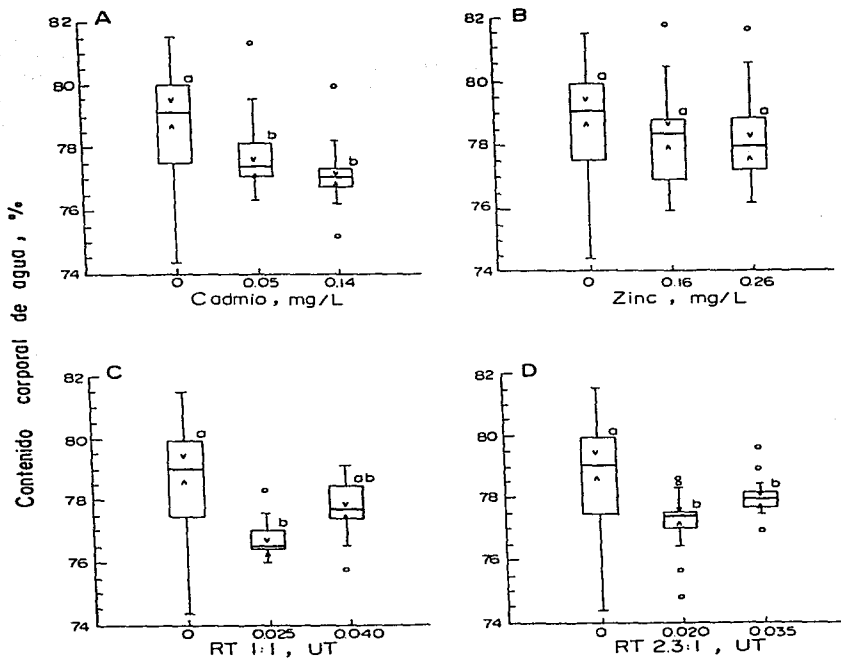


Fig. 9. Diagrama de cajas en paralelo del contenido relativo de agua de los juveniles de *P. setiferus* (H_2O , %), expuestos durante 21 días a diferentes concentraciones (mg/L) de cadmio (A) y de zinc (B) y durante 15 días a diferentes unidades de toxicidad (UT) de la mezcla de los metales en dos razones de toxicidad (RT) 1:1 C y 2.3:1 (D). Letras diferentes denotan diferencias significativas ($P < 0.05$).

experimentales se incluyen en el Anexo 2; en todos los casos, los modelos fueron significativos ($P < 0.01$).

Cabe señalar que tanto el peso húmedo (PH, g) como el peso seco (PS, g) de los organismos de todas las condiciones experimentales, fueron similares ($P > 0.05$; Tabla 10). En contraste, el contenido corporal de agua (%) fue modificado por el cadmio así como por las mezclas de los metales ($P < 0.05$); no obstante, el zinc no lo alteró ($P > 0.05$) (Tabla 10; Figs. 9A y B). En los camarones expuestos al cadmio, la cantidad relativa de agua disminuyó a medida que se incrementó la concentración del metal en el medio a 0.05 y 0.14 mg/L, con reducciones del 2 y 3% ($P < 0.05$) respectivamente con respecto al grupo testigo (Tabla 10; Fig. 9A).

De manera similar, en los camarones expuestos a la mezcla de los metales en una RT de 1:1, se observó una reducción del 3% ($P < 0.05$) en el contenido relativo de agua de los ejemplares expuestos a la UT menor (Tabla 10; Fig. 9C). Al exponer los organismos a una RT de 2.3:1, se observaron reducciones ($P < 0.05$) del 2 y 1% en el contenido relativo de agua de los camarones expuestos a 0.02 y 0.035 UT en relación al grupo control, exento de contaminantes (Tabla 10; Fig. 9D).

Los resultados obtenidos permiten inferir que el cadmio y las mezclas de los metales que lo contenían tanto en bajas como en altas concentraciones, afectó la permeabilidad de las membranas de los organismos, produciendo una pequeña (1-3 %) pero significativa deshidratación.

3. Balance Energético

Para medir el efecto de la exposición crónica a los metales y a sus mezclas, se determinó la energía potencial de crecimiento o campo de crecimiento de los especímenes expuestos por 21 días al cadmio y al zinc y por 15 días a las mezclas en dos razones de toxicidad. Con este objeto

se midieron las diferentes tasas fisiológicas ($\text{cal d}^{-1} \text{g}^{-1} \text{PS}$) y se integraron en la ecuación del balance energético mencionada. Los resultados obtenidos de las respuestas fisiológicas evaluadas en los juveniles de *P. setiferus*, se describen a continuación.

Ingestión (I)

La exposición crónica al cadmio, provocó una disminución del 19% ($P < 0.05$) en la tasa de ingestión ($\text{mg d}^{-1} \text{g}^{-1} \text{PS}$) de los camarones expuestos a la menor concentración del metal (0.05 mg/L) con respecto al grupo testigo. En los grupos expuestos al zinc, la tasa de ingestión no fue modificada por el metal (Tabla 11; Figs. 10A y B). En cambio, la exposición a las mezclas de cadmio y zinc disminuyó la tasa de ingestión de los camarones ($P < 0.05$) en un 12 % en la mezcla de los metales en RT de 1:1 y UT de 0.025 y en un 19 % en aquella con RT de 2.3:1 y UT mayor. Si bien en los demás grupos experimentales se observó una disminución similar en la tasa de ingestión, ésta no fue significativa ($P > 0.05$) (Tabla 11; Figs. 10C y D).

Tasa de Asimilación (A) y Eficiencia de Asimilación (U)

En los camarones expuestos al cadmio, la asimilación del alimento disminuyó ($P < 0.05$) entre 22 y 23 % con respecto al grupo testigo; sin embargo, el metal no modificó ($P > 0.05$) la eficiencia de asimilación (Tabla 11; Fig. 11A). En los camarones expuestos al zinc, no se observaron cambios en dichas tasas (Tabla 11; Fig. 11B). Sin embargo, en los organismos expuestos a la mezcla de los metales con diferentes RT (1:1 y 2.3:1), tanto la tasa de asimilación del alimento ingerido como la eficiencia con que éste fue asimilado disminuyeron significativamente ($P < 0.05$) (Tabla 11; Figs. 11C y D). Así, con respecto al testigo, en los grupos expuestos a 0.025 y 0.040 UT a una RT 1:1, la asimilación fue 14 y 18 % menor, en tanto que la eficiencia de asimilación disminuyó 2 y 3%. En los camarones expuestos a 0.020 y 0.035 UT a una RT 2.3:1, la asimilación del alimento disminuyó en un 23 y 22%

Tabla 11. Tasa de Ingestión (I; $\text{mg d}^{-1} \text{g}^{-1}$ PS), eficiencia de asimilación corregida (U' ; %) y tasa de asimilación (A; $\text{mg d}^{-1} \text{g}^{-1}$ PS) de los juveniles de *P. setiferus* expuestos por 21 días a diferentes concentraciones de cadmio y de zinc (mg/l) y por 15 días a la mezcla de los metales en diferentes unidades de toxicidad correspondientes a dos razones de toxicidad (RT). Valores medianos e intervalo de confianza de la mediana ($\alpha = 0.05$).

Condición	UT	I $\text{mg d}^{-1} \text{g}^{-1}$ PS	U' %	A $\text{mg d}^{-1} \text{g}^{-1}$ PS
Testigo		81.74 ± 5.34^a	80.32 ± 0.09^a	65.49 ± 4.29^a
Cadmio,	0.05	66.16 ± 8.32^b	80.97 ± 0.84^a	54.94 ± 6.74^b
	0.14	64.93 ± 14.27^{ab}	80.50 ± 0.42^a	52.57 ± 11.55^b
Zinc,	0.16	83.66 ± 7.26^a	80.75 ± 0.33^a	67.55 ± 5.86^a
	0.26	88.50 ± 15.49^a	80.49 ± 0.73^a	62.10 ± 7.38^a
RT 1:1	0.025	71.79 ± 3.40^b	78.66 ± 0.54^b	56.47 ± 2.68^b
	0.040	71.48 ± 9.71^{ab}	77.64 ± 0.16^b	53.45 ± 10.05^{ab}
RT 2.3:1	0.020	65.93 ± 8.67^{ab}	76.77 ± 0.30^b	50.61 ± 6.65^b
	0.035	65.88 ± 3.80^b	77.95 ± 0.36^b	51.35 ± 2.96^b

Letras diferentes en cada condición experimental denotan diferencias significativas respecto al grupo testigo ($P < 0.05$).

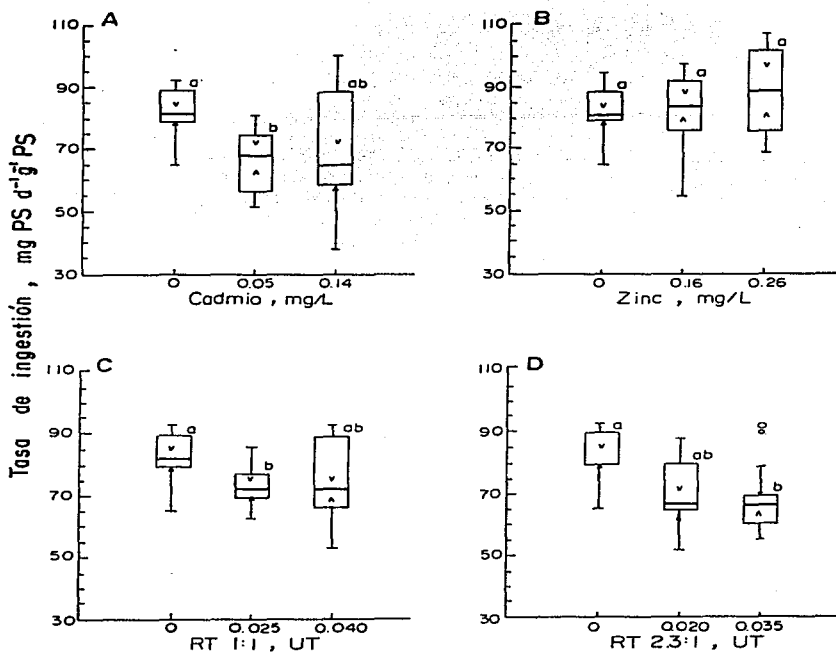


Fig. 10. Diagrama de cajas en paralelo de la tasa de ingestión de los juveniles de *P. setiferus* (I ; $\text{mg PS d}^{-1} \text{g}^{-1} \text{PS}$), expuestos durante 21 días a diferentes concentraciones (mg/L) de cadmio (A) y de zinc (B) y durante 15 días a diferentes unidades de toxicidad (UT) de la mezcla de los metales en dos razones de toxicidad (RT) 1:1 (C) y 2.3:1 (D). Letras diferentes denotan diferencias significativas ($P < 0.05$).

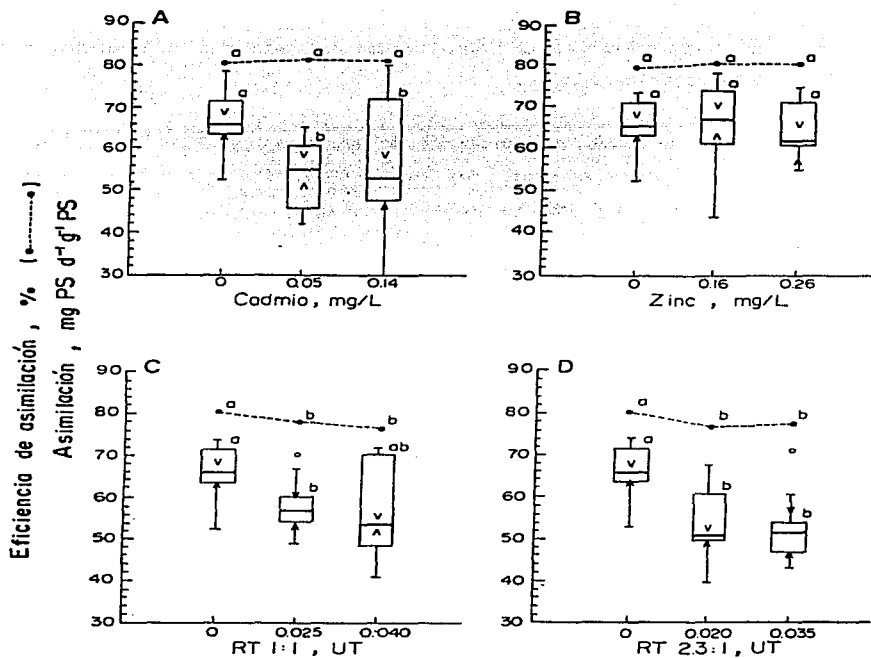


Fig. 11. Diagrama de cajas en paralelo de la asimilación (A; mg PS d⁻¹ g⁻¹ PS) y de la eficiencia de asimilación corregida (U'; %) de los juveniles de *P. setiferus*, expuestos durante 21 días a diferentes concentraciones (mg/L) de cadmio (A) y de zinc (B) y durante 15 días a diferentes unidades de toxicidad (UT) de la mezcla de los metales en dos razones de toxicidad (RT) 1:1 (C) y 2.3:1(D). Letras diferentes denotan diferencias significativas ($P < 0.05$).

respectivamente, en comparación con el grupo testigo en tanto que la eficiencia de asimilación fue 4 y 3 % menor que éste.

Los resultados obtenidos de la tasa de asimilación del alimento ($\text{mg PS d}^{-1} \text{g}^{-1} \text{PS}$) de los diferentes grupos experimentales se expresaron en $\text{cal d}^{-1} \text{g}^{-1} \text{PS}$ utilizando el factor de conversión de $5448.1 \pm 274.3 \text{ cal g}^{-1} \text{PS}$ (Anexo 3).

Respiración (R)

El consumo de oxígeno ($\text{mg h}^{-1} \text{g}^{-1} \text{PS}$) de los juveniles de *P. setiferus* expuestos al cadmio y al zinc durante 21 días y a la mezcla de los metales durante 15 días, se señala en la Tabla 12. En todos los casos, la exposición crónica a los contaminantes incrementó significativamente ($P < 0.05$) la tasa metabólica de los organismos.

El efecto a largo plazo del cadmio provocó un incremento en la tasa respiratoria del 20 % con respecto al grupo testigo ($P < 0.05$) cuando la concentración del metal en el medio se elevó a 0.14 mg/L (Tabla 12; Fig. 12A). Asimismo, la exposición crónica a la menor concentración de zinc produjo un aumento significativo ($P < 0.05$) en el consumo de oxígeno de los camarones, aunque mayor que el cadmio (Tabla 12; Fig. 12B); el incremento observado fue del 80 % con respecto al grupo testigo. En los camarones expuestos a la mayor concentración de zinc (0.26 mg/L) el incremento en la tasa respiratoria fue del 60 %, aunque dicho incremento no fue significativo ($P > 0.05$).

Al exponer los organismos a la mezcla de los metales a una RT de 1:1, la tasa respiratoria en los grupos expuestos a 0.025 y 0.040 UT se incrementó ($P < 0.05$) 24 y 26 % con respecto al grupo testigo (Tabla 12; Fig. 12C). Al elevar la RT a 2.3:1, el aumento en la tasa respiratoria fue mayor que el observado en la RT anterior. La exposición a 0.020 y 0.035 UT provocó un

Tabla 12. Consumo de oxígeno (VO_2 ; $\text{mg h}^{-1} \text{g}^{-1} \text{PS}$), excreción nitrogenada (N-NH_4^+ ; $\text{mg h}^{-1} \text{g}^{-1} \text{PS}$) de los juveniles de *P. setiferus* expuestos por 21 días al cadmio y al zinc (mg/L) y por 15 días a la mezcla de los metales en diferentes unidades de toxicidad (RT) correspondientes a dos razones de toxicidad (UT). Valores medianos e intervalo de confianza de la mediana ($\alpha = 0.05$). La concentración de los metales (mg/L) en las mezclas, se muestran en paréntesis.

Condición	VO_2 $\text{mg h}^{-1} \text{g}^{-1} \text{PS}$	N-NH_4^+ $\text{mg h}^{-1} \text{g}^{-1} \text{PS}$
Testigo	1.32 ± 0.10^a	0.27 ± 0.08^a
Cadmio, 0.05	1.51 ± 0.03^{ab}	0.20 ± 0.05^a
0.14	1.58 ± 0.34^b	0.17 ± 0.06^a
Zinc, 0.16	2.37 ± 0.35^b	0.21 ± 0.05^a
0.26	2.11 ± 0.42^{ab}	0.13 ± 0.04^a
RT 1:1 (Cd ; Zn)		
UT 0.025 (0.012 ; 0.548)	1.63 ± 0.23^b	0.11 ± 0.03^b
0.040 (0.020 ; 0.877)	1.67 ± 0.19^b	0.10 ± 0.02^b
RT 2.3:1 (Cd ; Zn)		
UT 0.020 (0.014 ; 0.263)	2.21 ± 0.41^b	0.26 ± 0.09^{ab}
0.035 (0.031 ; 0.597)	2.00 ± 0.53^b	0.16 ± 0.02^b

Letras diferentes en cada condición experimental denotan diferencias significativas respecto al grupo testigo ($P < 0.05$).

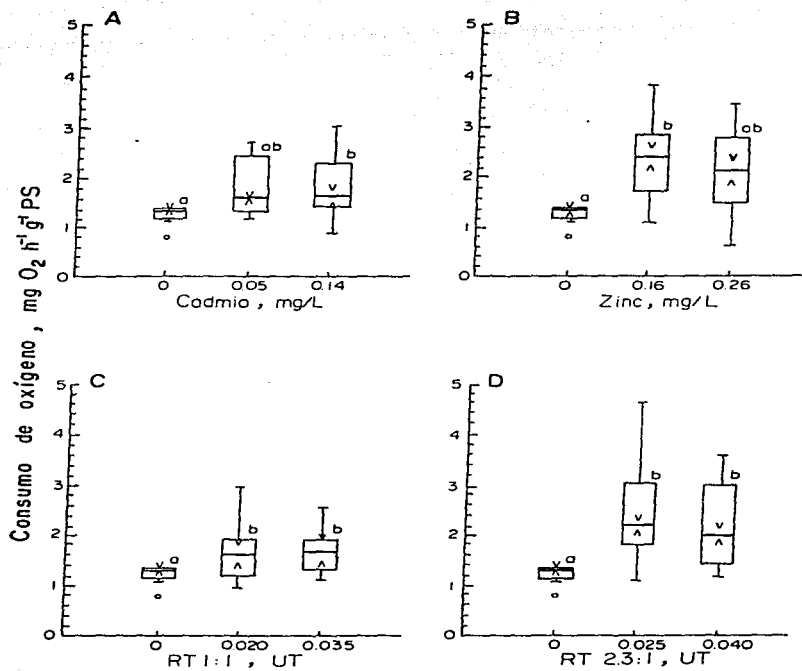


Fig. 12. Diagrama de cajas en paralelo del consumo de oxígeno ($\text{mg O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ PS}$) de los juveniles de *P. setiferus* expuestos durante 21 días a diferentes concentraciones (mg/L) de cadmio (A) y de zinc (B) y durante 15 días a diferentes unidades de toxicidad (UT) de la mezcla de los metales en dos razones de toxicidad (RT) 1:1 (C) y 2.3:1(D). Letras diferentes denotan diferencias significativas ($P < 0.05$).

incremento significativo ($P < 0.05$) en el consumo de oxígeno del 67 y 52 % en relación al grupo testigo (Tabla 12; Fig. 12D).

Es evidente que el zinc modifica en mayor grado la tasa respiratoria de los camarones que el cadmio. Sin embargo, al ocurrir en mezclas con el cadmio, resalta la complejidad de esta interacción sobre la tasa respiratoria de los camarones. En los organismos expuestos a la mezcla de los metales a 0.025 UT en una RT 1:1, al aumentar la RT a 2.3:1 en 0.035 UT aún en concentraciones similares de zinc en la mezcla, el incremento del 58 % de los niveles de cadmio provocó un aumento ($P < 0.05$) del 23 % en la tasa respiratoria; asimismo, al exponer a los camarones a 0.020 UT en una RT 2.3:1, independientemente de la disminución del 52% de los niveles de zinc en la mezcla, aumentos del 17 % en la concentración de cadmio incrementaron en un 36% ($P < 0.05$) el oxígeno consumido por los organismos. El aumento observado en la tasa respiratoria en esta última condición con respecto al grupo testigo, fue similar al observado en la exposición a 0.26 mg/L. Los resultados obtenidos demuestran la complejidad de la acción conjunta del cadmio y zinc sobre el consumo de oxígeno de los organismos, lo cual dificulta la interpretación del efecto tóxico de las mezclas.

Excreción Nitrogenada (N)

La excreción de nitrógeno amoniacal ($\text{mg N-NH}_4^+ \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ PS}$) de los juveniles de *P. setiferus*, expuestos por 21 días al cadmio y al zinc, mostró una clara tendencia a disminuir a medida que se incrementaron las concentraciones de los metales en el medio, aunque las diferencias con el grupo testigo no fueron significativas ($P > 0.05$) (Tabla 12; Figs. 13A y B).

Sin embargo la exposición crónica (15 días) a la mezcla de los metales en una RT de 1:1, redujo significativamente la cantidad de amonio excretado entre 59 y 64 % ($P < 0.05$) con respecto al grupo testigo, en los camarones expuestos a ambas UT (Tabla 12; Fig. 13C). Al elevar la RT de la mezcla de los metales a 2.3:1, la disminución en la tasa de excreción

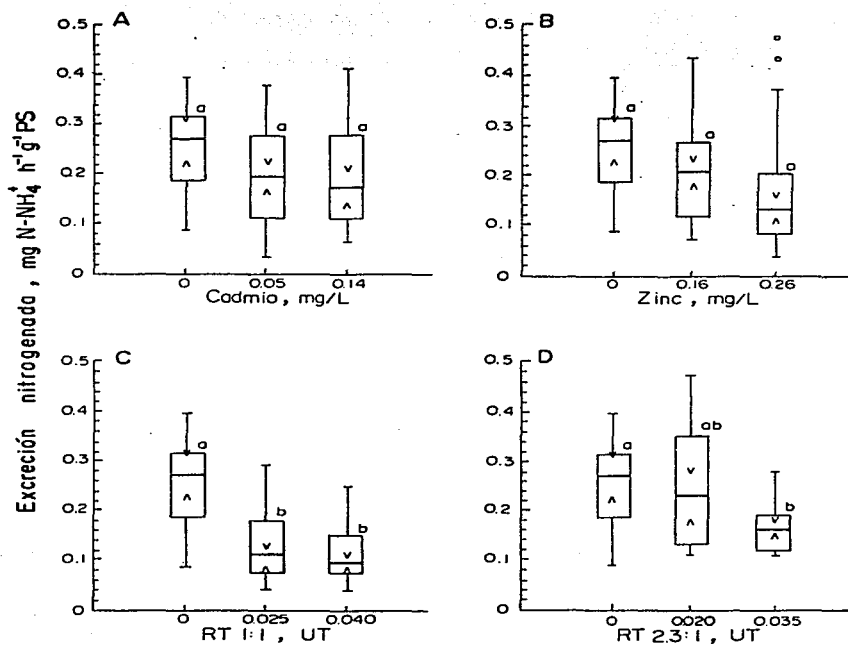


Fig. 13. Diagrama de cajas en paralelo de la excreción nitrogenada (mg N-NH₄⁺ h⁻¹ g⁻¹ PS) de los juveniles de *P. setiferus* expuestos durante 21 días a diferentes concentraciones (mg/L) de cadmio (A) y de zinc (B) y durante 15 días a diferentes unidades de toxicidad (UT) de la mezcla de los metales en dos razones de toxicidad (RT) 1:1 C y 2.3:1 (D). Letras diferentes denotan diferencias significativas (P < 0.05).

nitrogenada de los ejemplares fue menor que en la mezcla anterior (Tabla 12; Fig. 13D); con respecto al grupo control, se observó un decremento del 41% ($P < 0.05$) en los organismos expuestos a 0.035 UT.

Exuvia (E)

La tasa de muda ($e d^{-1}$) de los camarones expuestos a las diferentes concentraciones de cadmio, de zinc y de sus mezclas, fueron similares ($P > 0.05$) al grupo testigo (Tabla 13); la tasa de muda osciló de 0.07 a 0.10 $e d^{-1}$ relacionada con periodos de intermuda de 10 a 14 días.

La relación del peso seco de la exuvia y el peso seco de los juveniles de *P. setiferus* ($g\text{ PSe } g^{-1}\text{ PS}$) no fue modificada por la presencia de los metales ($P > 0.05$). Este mismo comportamiento se observó en el contenido calórico de las exuvias de los camarones ($cal\text{ } g^{-1}\text{ PSe}$) de los diferentes grupos experimentales y cuyos valores se incluyen en la Tabla 13. El contenido calórico de las exuvias se utilizó para expresar los resultados en $cal\text{ } d^{-1}\text{ } g^{-1}\text{ PS}$.

Campo de Crecimiento (P)

El campo de crecimiento (P) se calculó de la diferencia entre la energía contenida en el alimento asimilado (A) y la energía utilizada en el metabolismo aerobio (R), la excreción de compuestos nitrogenados (N) y la exuvia (E):

$$P = A - (R + N + E)$$

La exposición de los juveniles de *P. setiferus* al cadmio y al zinc, así como a la mezcla de estos, redujo el campo de crecimiento de los organismos (Tabla 14). En los camarones expuestos durante 21 días al cadmio, la disminución en el campo de crecimiento fue mayor a medida que

Tabla 13. Tasa de muda (TM; e d⁻¹), relación del peso seco de la exuvia y el peso seco de los organismos (g PSe g⁻¹ PS) y contenido calórico de las exuvias (cal g⁻¹ PSe) de los juveniles de *P. setiferus* expuestos al cadmio y al zinc (mg/l) y a la mezcla de los metales en diferentes unidades de toxicidad (UT) correspondientes a dos razones de toxicidad (RT). Valores medianos e intervalo de confianza de la mediana ($\alpha = 0.05$).

Condición	UT	TM, e d ⁻¹	g PSe g ⁻¹ PS	cal g ⁻¹ PSe
Testigo		0.09	0.111 ± 0.02	2 765 ± 408
Cadmio,	0.05	0.07	0.109 ± 0.01	3 440 ± 205
	0.14	0.10	0.088 ± 0.01	3 160 ± 189
Zinc,	0.16	0.08	0.103 ± 0.02	3 320 ± 410
	0.26	0.08	0.109 ± 0.01	3 320 ± 382
RT 1:1	0.020	0.08	0.097 ± 0.03	3 030 ± 215
	0.035	0.08	0.109 ± 0.02	3 220 ± 186
RT 2.3:1	0.025	0.07	0.093 ± 0.03	3 250 ± 316
	0.040	0.07	0.103 ± 0.02	3 250 ± 284

se incrementó la concentración del metal en el medio, de 35 y 42 % con respecto al grupo testigo en los ejemplares expuestos a 0.05 y 0.14 mg/L respectivamente. En relación al zinc, la exposición crónica al metal produjo una disminución en el campo de crecimiento de 35 % tanto en 0.16 como en 0.26 mg/L.

En los camarones expuestos durante 15 días a la mezcla de los metales a una RT de 1:1, la disminución en el campo de crecimiento con respecto al grupo testigo fue mayor al aumentar la UT de la mezcla, del 21 % en 0.025 UT al 38 % en 0.040 UT (Tabla 14). La reducción observada en los organismos expuestos a 0.025 UT fue menor que la producida de manera aislada por el cadmio y el zinc. Al aumentar la RT a 2.3:1, la reducción en el campo de crecimiento con respecto al grupo testigo en los ejemplares expuestos a 0.020 y 0.035 UT fue del 78 y 62 % respectivamente (Tabla 14).

Así, es evidente el efecto de la interacción de los metales cadmio y zinc sobre el campo de crecimiento de los camarones. En concentraciones similares de zinc (RT 1:1, UT 0.025 - RT 2.3:1, UT 0.035), el incremento del cadmio de 0.012 a 0.031 mg/L redujo el campo de crecimiento en un 51 %; es importante notar que independientemente de la reducción del 52 % en las concentraciones de zinc (RT 1:1, UT 0.025 - RT 2.3:1; UT 0.020), un pequeño incremento en los niveles de cadmio (14%) produjo una disminución del 72 % en el crecimiento potencial de los especímenes. En esta última condición (RT 2.3:1; UT 0.020) fue notoria la interacción del cadmio con el zinc (0.014 mg Cd/L; 0.263 mg Zn/L) reflejada en una reducción del 62 % del campo de crecimiento con respecto al grupo testigo. Dicha reducción fue mayor que la producida (35 %) por concentraciones similares del metal (0.26 mg/L) en forma aislada.

La disminución del campo de crecimiento de los camarones expuestos a cada metal y a sus mezclas se atribuyeron a las modificaciones tanto en la energía contenida en el alimento ingerido (I) como en la distribución de la energía asimilada (A) a los diversos procesos fisiológicos de los organismos (Tabla 14).

Tabla 14. Balance de energía ($\text{cal d}^{-1} \text{g}^{-1} \text{PS}$) de los juveniles de *P. setiferus* expuestos durante 21 días al cadmio y al zinc (mg/L) y durante 15 días a la mezcla de los metales en diferentes unidades de toxicidad (UT) correspondientes a dos razones de toxicidad (RT). Valores medianos e intervalo de confianza de la mediana ($\alpha = 0.05$).

Condición	I	A	R	N	E	P
Testigo	445.3±29.1	356.8±23.4 (80.1)*	105.2±8.0 (29.5)	38.5±11.5 (10.8)	25.0±2.8 (7.0)	188.1 (52.7)
Cd, 0.05	360.4±45.3	299.3±36.7 (83.0)*	123.5±29.5 (41.3)	28.5±7.1 (9.5)	25.6±2.2 (8.6)	121.7 (40.6)
0.14	353.7±77.7	286.4±63.0 (81.0)*	125.9±27.1 (43.9)	24.2±8.6 (8.5)	27.7±0.7 (9.7)	108.7 (37.9)
Zn, 0.16	455.8±39.6	368.0±31.9 (80.8)*	188.8±27.9 (51.3)	29.9±7.1 (8.1)	26.6±3.2 (7.2)	122.7 (33.3)
0.26	482.2±84.4	334.8±55.0 (69.4)*	168.1±33.5 (50.2)	18.5±5.7 (5.5)	24.1±4.6 (7.2)	124.2 (37.1)
RT 1:1 (Cd; Zn) UT 0.025 (0.012; 0.548)	391.1±18.5	316.9±23.4 (81.0)*	129.9±18.3 (41.0)	15.7±4.3 (4.9)	23.6±7.5 (7.4)	147.8 (46.7)
UT 0.040 (0.020; 0.877)	389.4±52.9	291.2±54.8 (74.7)*	133.1±15.1 (45.7)	13.5±2.9 (4.7)	24.8±8.7 (9.5)	116.8 (40.1)
RT 2.3:1 (Cd; Zn) UT 0.020 (0.014; 0.263)	359.2±47.2	275.7±36.2 (76.7)*	176.1±36.7 (63.9)	37.1±12.8 (13.4)	21.3±7.2 (7.7)	41.3 (14.9)
0.035 (0.031; 0.597)	358.9±20.7	277.8±16.7 (77.4)*	159.4±42.2 (57.4)	22.8±2.9 (8.2)	23.3±7.4 (8.4)	72.3 (26.0)

I = tasa de ingestión; P = A - (R + N + M); P = campo de crecimiento; R = respiración; N = excreción nitrogenada; M = muda. En () * se señala el porcentaje de la energía ingerida que fue asimilada; en () se incluye el porcentaje de la energía invertida en cada proceso fisiológico.

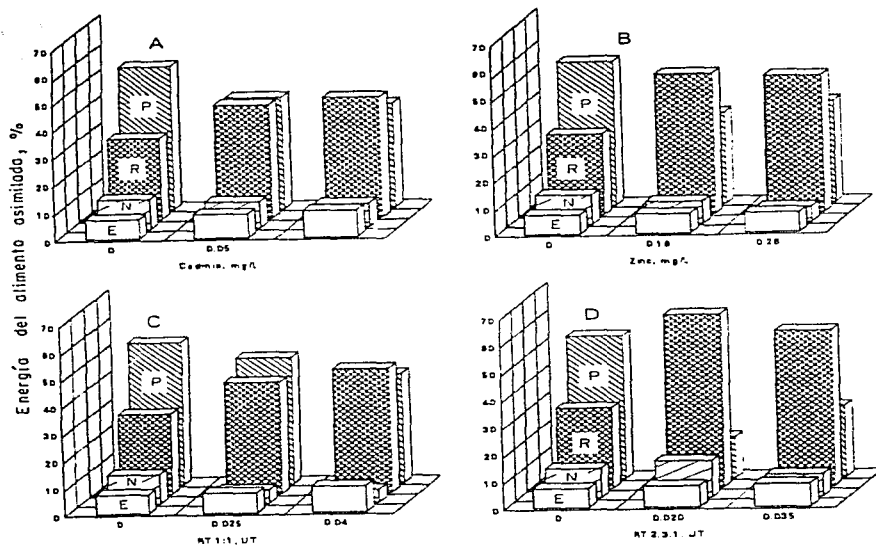


Fig. 14. Distribución de la energía asimilada (%) en los procesos fisiológicos que conforman el balance energético de los juveniles de *P. setiferus*, expuestos durante 21 días a diferentes concentraciones (mg/L) de cadmio (A) y de zinc (B) y durante 15 días a diferentes unidades de toxicidad (UT) de la mezcla de los metales en dos razones de toxicidad (RT) 1:1 (C) y 2.3:1(D).

En los camarones del grupo testigo, de la energía contenida en el alimento ingerido (I) los organismos asimilaron (A) el 80 % y de esta fracción, la mayor parte se canalizó al campo de crecimiento (P; 52.7 %), seguido de la respiración (R; 29.5 %), la excreción nitrogenada (N; 10.8 %) y la exuvia (E; 7 %) (Tabla 14; Fig. 14). En los grupos expuestos al cadmio, al zinc, y a las mezclas los camarones asimilaron entre el 69 y 83 % del contenido energético del alimento ingerido; las mayores proporciones de la energía contenida en el alimento asimilado, se relacionaron con la respiración (R; 41-57.4%) y en menor grado con la excreción amoniacal (N; 4.7-9.5%) y la exuvia (E; 7.2-9.7%).

En los grupos expuestos al cadmio, y a las mezclas de los metales en RT 1:1, la reducción en la energía potencial de crecimiento se relacionó por una parte con la disminución tanto en la energía contenida en el alimento ingerido como en el asimilado y con el incremento de la energía utilizada en la respiración, por la otra. Estas alteraciones fueron mayores al aumentar la RT de los metales a 2.3:1, ocasionado la mayor reducción en el campo de crecimiento de los especímenes. En contraste, la reducción en el campo de crecimiento de los camarones expuestos al zinc fue producto únicamente del incremento en la energía empleada en el metabolismo aerobio.

Eficiencias de Crecimiento

Una vez conocido el valor de la energía potencial de crecimiento de los juveniles de *P. setiferus* organismos (P), en la diferentes condiciones experimentales, se calcularon las eficiencias de crecimiento bruta y neta (K_1 y K_2). La eficiencia de crecimiento bruta es la razón entre \underline{P} y el contenido calórico del alimento ingerido (I; $K_1 = P/I$); la eficiencia de crecimiento neta indica la razón entre \underline{P} y el valor calórico de la fracción asimilada de la energía contenida en el alimento ingerido (A; $K_2 = P/A$). Tales razones reflejan la capacidad del organismos de convertir el alimento incorporado en tejido somático (Klekovsky y Duncan, 1975).

Tanto el cadmio como el zinc redujeron las eficiencias de crecimiento de los camarones. La magnitud del efecto del cadmio sobre K1 y K2 fue similar tanto en concentraciones bajas como altas, con disminución del 22.5 y 28 % respecto al grupo testigo. El zinc provocó una disminución (30 y 37 %) ligeramente superior (Tabla 15).

Al exponer los ejemplares durante 15 días a la mezcla de los metales en RT de 1:1 y 0.025 UT, se observó una ligera (11 y 12 %) reducción en K1 y K2 con respecto al grupo testigo, pero al aumentar la UT de la mezcla, la disminución de 24 y 27 %, respectivamente, similar a la provocada por el cadmio de manera aislada. Al incrementarse la RT de los metales a 2.3:1, el efecto en las eficiencias de crecimiento de los especímenes fue drástico. En estas condiciones se observó la mayor reducción en las K1 y K2 con respecto al grupo testigo. Las mayores reducciones en la K1 y K2, del 73 %, se observaron en los organismos expuestos a 0.020 UT mientras que en 0.035 UT, las K1 y K2 disminuyeron 49 y 51 % respectivamente.

En concentraciones similares de zinc en las mezclas (RT 1:1, 0.025 UT - RT 2.3:1, 0.035 UT), el incremento de las concentraciones de cadmio en la mezcla redujolas K1 y K2 en 43 y 44 %, respectivamente. Así mismo, el incremento del 14% en la concentración de cadmio en la mezcla (RT 1:1, 0.020 UT - RT 2.3:1, 0.020 UT), redujo las K1 y K2 en 70 y 68 %, aún cuando la concentración de zinc disminuyó en un 52 %. La acción conjunto del cadmio con el zinc, fue evidente además en los organismos expuestos a 0.025 UT en una RT 1:1, donde aún en bajas concentraciones de cadmio en la mezcla (0.014 mg/L) la disminución de las K1 y K2 de los camarones fue mucho mayor que la observada en la exposición aislada al zinc, aún en concentraciones similares del metal (0.26 mg/L). Por lo tanto, la disminución en las eficiencias de crecimiento de los camarones son causadas por la interacción sinérgica de los metales.

Tabla 15. Eficiencias de crecimiento bruta ($K_1 = P/I$) y neta ($K_2 = P/A$) de los juveniles de *P. setiferus* expuestos por 21 días al cadmio y al zinc (mg/L) y por 15 días a la mezcla de los metales en diferentes unidades de toxicidad correspondientes a dos razones de toxicidad (RT). La concentración de los metales (mg/L) en las mezclas, se muestran en paréntesis.

Condición	K_1	K_2
Testigo	42.36	52.73
Cadmio, 0.05	32.92	40.65
0.14	30.72	37.93
Zinc, 0.16	26.92	33.33
0.26	29.52	37.05
RT 1:1 (Cd ; Zn)		
UT 0.025 (0.012 ; 0.548)	37.79	46.63
0.040 (0.020 ; 0.877)	31.14	40.10
RT 2.3:1 (Cd ; Zn)		
UT 0.020 (0.014 ; 0.263)	11.50	14.98
0.035 (0.031 ; 0.597)	21.42	26.03

4. Relación Atómica O/N

Los valores obtenidos del consumo de oxígeno y de la excreción nitrogenada de los juveniles de *P. setiferus* de las diferentes condiciones experimentales, se integraron en la razón atómica O/N, la cual es un indicador del sustrato energético utilizado por los organismos. En los camarones expuestos al cadmio, al zinc y a sus mezclas, se observó un incremento significativo en los valores de la razón ($P < 0.05$). Con respecto al grupo testigo, los incrementos variaron entre el 41 % en los organismos expuestos a 0.14 mg Cd/L hasta 64 % en los mantenidos en la mayor concentración de zinc (Tabla 16; Figs. 15A y B).

De manera similar, la exposición a la mezcla de los metales a una RT 1:1 incrementó significativamente ($P < 0.05$) la razón O/N de los camarones en un 60 y 65 % respecto al grupo testigo en los grupos expuestos a 0.025 y 0.040 UT (Tabla 16; Fig. 15C). Al aumentar la RT de la mezcla a 2.3:1, el incremento ($P < 0.05$) en los valores de la razón O/N fue del 48 y 54 % en los organismos expuestos a 0.020 y 0.035 UT, respectivamente (Tabla 16; Fig. 15D).

5. Bioacumulación

La acumulación ($\mu\text{g g}^{-1}$ PS; $X \pm \text{ES}$) de los metales en los juveniles de *P. setiferus* expuestos al cadmio, al zinc y a la mezcla de los metales se señala en la Tabla 17. En los organismos provenientes del medio natural, las concentraciones de cadmio y zinc fueron de 0.84 ± 0.10 y $74.21 \pm 11.08 \mu\text{g g}^{-1}$ PS, respectivamente; los niveles de los metales en las muestras de agua de la zona de captura fueron de 0.022 ± 0.02 mg/L de cadmio y 0.282 ± 0.006 mg/L de zinc. En los ejemplares del grupo testigo, mantenidos en condiciones experimentales de 11 ± 1 ‰ y $24 \pm 1^\circ\text{C}$, el contenido de los metales disminuyó a $0.58 \pm 0.08 \mu\text{g Cd g}^{-1}$ PS y $56.71 \pm 1.31 \mu\text{g Zn g}^{-1}$ PS, lo cual se podría atribuir a procesos de desintoxicación en los camarones durante el periodo de mantenimiento en ausencia de los contaminantes. En estas condiciones, el 48 % del Cd y el 10 % del Zn corporal del grupo testigo fue eliminado por la exuvia durante el proceso

Tabla 16. Razón atómica O/N de los juveniles de *P. setiferus* expuestos por 21 días al cadmio y al zinc (mg/L) y por 15 días a la mezcla de los metales en diferentes unidades de toxicidad (UT) correspondientes a dos razones de toxicidad (RT). Valores medianos e intervalo de confianza de la mediana ($\alpha = 0.05$).

Condición	O / N
Testigo	6.81 ± 1.91 ^a
Cadmio, 0.05	11.18 ± 4.48 ^{ab}
0.14	11.46 ± 2.57 ^b
Zinc, 0.16	14.24 ± 2.44 ^b
0.26	19.12 ± 5.35 ^c
RT 1:1 (Cd ; Zn)	
UT 0.025 (0.012 ; 0.548)	17.08 ± 2.68 ^b
0.040 (0.020 ; 0.877)	19.62 ± 2.83 ^b
RT 2.3:1 (Cd ; Zn)	
UT 0.020 (0.014 ; 0.263)	13.07 ± 2.42 ^b
0.035 (0.031 ; 0.597)	14.68 ± 2.21 ^b

Letras diferentes en cada condición experimental denotan diferencias significativas respecto al grupo testigo ($P < 0.05$).

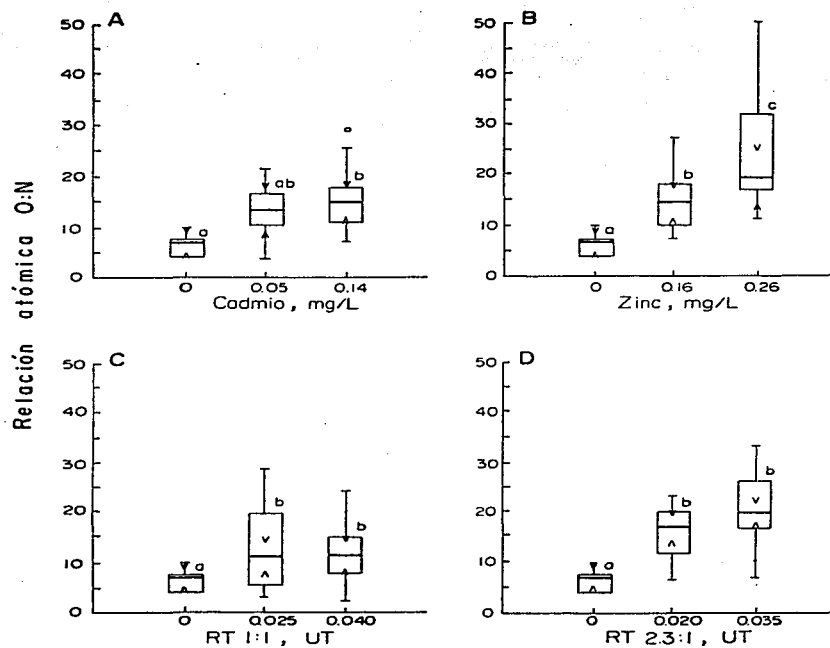


Fig. 15. Diagrama de cajas en paralelo de la razón atómica O/N de los juveniles de *P. setiferus* expuestos durante 21 días a diferentes concentraciones (mg/L) de cadmio (A) y de zinc (B) y durante 15 días a diferentes unidades de toxicidad (UT) de la mezcla de los metales en dos razones de toxicidad (RT) 1:1 (C) y 2.3:1(D). Letras diferentes denotan diferencias significativas ($P < 0.05$).

de muda (Figs. 16 A y B). Cabe señalar que las concentraciones de los metales en el medio externo de este grupo fueron de 0.025 ± 0.001 mg Cd/L y de 0.0315 ± 0.001 mg Zn/L, respectivamente, considerados como los niveles control o basales.

Al exponer los camarones al cadmio, la acumulación del metal tanto en los organismos como en la exuvia se incrementó drásticamente al aumentar la concentración del cadmio en el medio (Tabla 17; Fig. 16A). En los ejemplares expuestos a 0.05 y 0.14 mg Cd/L, el contenido corporal del metal fue 38 y 58 veces mayor que el del grupo testigo ($P < 0.05$); a su vez, la concentración del metal en la exuvia se incrementó 12 y 17 veces respectivamente ($P < 0.05$). La proporción del cadmio corporal que es eliminado por la exuvia es similar (entre 11 y 15%) independientemente del incremento en las concentraciones externas del metal. Estos resultados sugieren que la eliminación del cadmio por la exuvia tiene una capacidad limitada y por lo tanto no es un mecanismo eficiente de desintoxicación del metal. Cabe señalar que en los camarones, la concentración del zinc tanto en el tejido corporal como en la exuvia se mantuvo similar a los del grupo testigo ($P > 0.05$).

En los ejemplares expuestos al zinc la concentración del metal en los organismos fue similar a la del grupo testigo ($P > 0.05$) independientemente del incremento de los niveles del metal en el medio, de 0.16 y 0.26 mg/L (Tabla 17; Fig. 16B). Estos resultados permiten afirmar que los juveniles de *P. setiferus* regulan los niveles interno de zinc en concentraciones externas hasta de 0.26 mg/L. La acumulación del zinc en la exuvia de los camarones expuestos a 0.16 y 0.26 mg/L se incrementó 2 y 4 veces con respecto al grupo testigo, lo cual implica que del 20 al 44 % del metal corporal se eliminó por la exuvia. Los resultados sugieren que la muda constituye un mecanismo importante y eficiente de desintoxicación del zinc. Cabe mencionar que en los especímenes, las concentraciones de cadmio tanto en los organismos como en la exuvia fueron similares a los del grupo testigo ($P > 0.05$).

La exposición crónica de los camarones a las mezclas de cadmio y zinc provocó cambios en los patrones de acumulación de los metales, mencionados previamente. Al exponer los camarones a

Tabla 17. Bioacumulación del cadmio y zinc ($\mu\text{g g}^{-1}$ PS) en la exuvia y en los juveniles de *P. setiferus* expuestos por 21 días al cadmio y al zinc (mg/L) y por 15 días a la mezcla de los metales en diferentes unidades de toxicidad (UT) correspondientes a dos razones de toxicidad (RT). Valores de $\bar{X} \pm \text{ES}$. La concentración de los metales (mg/L) en las mezclas, se muestran en paréntesis.

Condición	Exuvia, $\mu\text{g g}^{-1}$ PS		Organismo, $\mu\text{g g}^{-1}$ PS	
	Cd	Zn	Cd	Zn
Testigo	0.28 ± 0.00^a	5.94 ± 0.02^a	0.58 ± 0.08^a	56.71 ± 1.31^a
Cadmio, 0.05	3.27 ± 0.01^b	6.02 ± 0.03^a	22.11 ± 1.20^b	51.58 ± 0.68^a
	0.14 3.63 ± 0.04^b	5.01 ± 0.02^a	33.67 ± 0.68^c	52.29 ± 1.10^a
Zinc, 0.16	0.29 ± 0.01^a	11.76 ± 0.03^b	0.50 ± 0.00^a	58.21 ± 1.97^a
	0.26 0.31 ± 0.02^a	25.37 ± 0.06^c	0.58 ± 0.08^a	57.88 ± 1.53^a
RT 1:1 (Cd ; Zn)				
UT 0.025 (0.012 ; 0.548)	0.24 ± 0.00^a	6.93 ± 0.03^a	0.93 ± 0.09^a	79.92 ± 8.44^b
0.040 (0.020 ; 0.877)	0.28 ± 0.00^a	7.85 ± 0.03^a	0.73 ± 0.06^a	103.43 ± 35.79^b
RT 2.3:1 (Cd ; Zn)				
UT 0.020 (0.014 ; 0.263)	0.31 ± 0.03^a	4.86 ± 0.01^a	1.37 ± 0.12^b	177.66 ± 29.40^b
0.035 (0.031 ; 0.597)	0.31 ± 0.00^a	5.83 ± 0.01^a	1.06 ± 0.22^b	233.33 ± 7.97^c

Letras diferentes en cada condición experimental denotan diferencias significativas respecto al grupo testigo ($P < 0.05$).

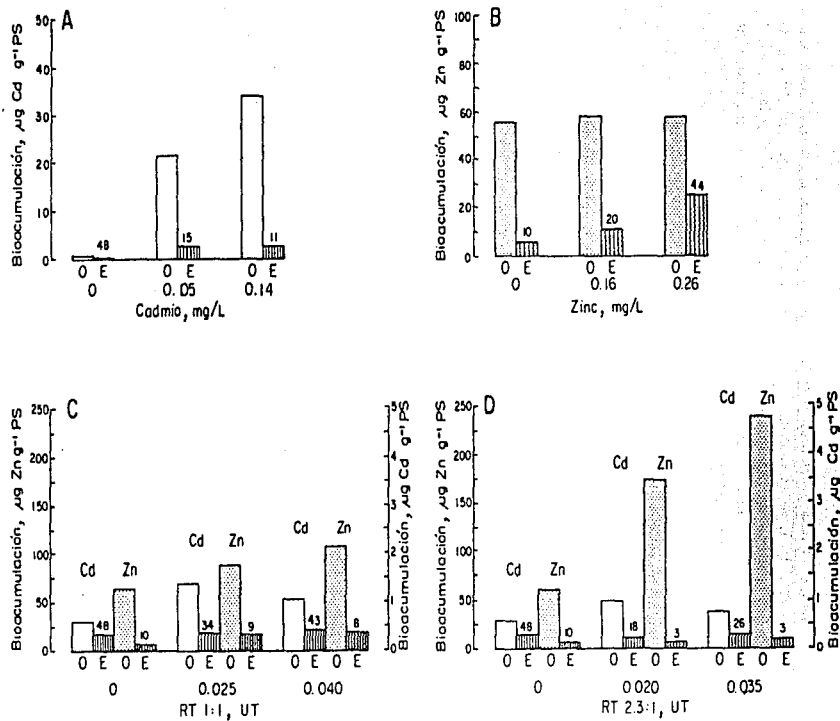


Fig. 16. Bioacumulación ($\mu\text{g g}^{-1}\text{PS}$) de cadmio y zinc en la exuvia (E) y en los juveniles de *P. setiferus* (O), expuestos durante 21 días a diferentes concentraciones (mg/L) de cadmio (A) y de zinc (B) y durante 15 días a diferentes unidades de toxicidad (UT) de la mezcla de los metales en dos razones de toxicidad (RT) 1:1 (C) y 2.3:1 (D). Se incluye el porcentaje (%) del metal corporal que es eliminado por la exuvia.

una RT de 1:1, la presencia en la mezcla de niveles tan bajos de cadmio como 0.012 y 0.020 mg/L correspondientes a 0.025 y 0.040 UT incrementaron al doble la bioacumulación del metal con respecto al grupo testigo ($P < 0.05$) (Tabla 17; Fig. 16C); sin embargo, en ambas UT la concentración de cadmio en la exuvia de los ejemplares fue similar al grupo testigo ($P > 0.05$) lo cual sugiere que en mezclas, las concentraciones tan bajas del metal no activaron la eliminación del metal por la exuvia.

Con respecto al zinc, se observó que al elevarse las concentraciones del metal en las mezclas, en 0.548 y 0.877 mg/L correspondientes a 0.025 y 0.040 UT, la bioacumulación del metal fue 1.4 y 1.8 veces mayor que el grupo testigo ($P < 0.05$). Es evidente que en estas concentraciones los camarones pierden la capacidad de regulación corporal del metal. El contenido del zinc en las exuvias de los camarones expuestos en las mezclas en RT de 1:1, permaneció constante independientemente del incremento en las UT; asimismo, el porcentaje del zinc corporal eliminado por la muda fue similar (8 a 9 %) al del grupo testigo ($P < 0.05$). Estos resultados demuestran que en mezclas de los metales en RT de 1:1, la desintoxicación del zinc a través de la exuvia es inhibida lo que explicaría el aumento de los niveles corporales del metal.

Al elevar la RT de los metales en la mezcla a 2.3:1, la interacción de los metales modificó drásticamente el patrón de acumulación del cadmio y fundamentalmente del zinc en los juveniles de *P. setiferus* (Tabla 17; Fig. 16D). Con respecto al cadmio, el incremento de 0.014 y 0.031 mg/L correspondientes a 0.020 y 0.035 UT aumentó la acumulación del metal en los organismos 1.6 y 0.8 veces respecto al grupo testigo; este incremento fue menor que el observado en la RT anterior aún cuando las concentraciones de cadmio en la mezcla a una RT de 2.3:1 fueron mayores. Asimismo, se observó un incremento en la acumulación del metal en las exuvias, de 1.3 y 1.2 veces en los grupos expuestos a 0.020 y 0.035 UT. Los resultados sugieren que en una RT de 2.3:1 este mecanismo de desintoxicación opera desde una concentración de cadmio de 0.014 mg/L en la mezcla.

En referencia al zinc, se observó que al incrementarse la concentración del metal en las mezclas a 0.263 y 0.598 mg/L correspondientes a 0.020 y 0.035 UT, la acumulación del metal en los organismos fue 3 y 4 veces mayor ($P < 0.05$) en relación al grupo control. Estos resultados hacen evidente el efecto de la interacción de las mezclas de los metales en la pérdida de los mecanismos de regulación corporal del zinc. Aunado a lo anterior, se observó que las concentraciones de zinc en la exuvia fueron similares al grupo testigo ($P > 0.05$), lo cual se relaciona con el deterioro de este mecanismo de desintoxicación. Asimismo, al igual que en la mezcla anterior, la acumulación del metal en los organismos fue mayor que en la exuvia de los camarones.

DISCUSION

En los juveniles de *Penaeus setiferus*, la evaluación del efecto tóxico del cadmio, del zinc y de las mezclas de los metales, se efectuó en la salinidad correspondiente al punto isosmótico de la especie. Diversos autores señalan que el punto isosmótico corresponde a la salinidad óptima para el desarrollo de los peneidos estuarinos, dado que al reducirse la energía involucrada en los procesos de osmorregulación, ésta puede destinarse al crecimiento (Venkataramiah *et al.*, 1974; Bishop *et al.*, 1980; Castille y Lawrence, 1981). El punto isosmótico determinado para los juveniles de *P. setiferus* fue de $10.5 \pm 1\%$ S (310 mOsm) en $23 \pm 1^\circ\text{C}$. Este valor difiere al determinado para la misma especie por otros autores (McFarland *et al.*, 1963; Espina *et al.*, 1976). Las diferencias probablemente se deban a las variaciones intrapoblaciones como lo señalan Espina *et al.* (1976).

Las especies estuarinas como los camarones peneidos, son particularmente sensibles al efecto tóxico de los metales pesados en salinidades menores a la óptima para los organismos. Así, en diversos crustáceos estuarinos se ha señalado el efecto tóxico sinérgico del cadmio y del zinc en salinidades menores al punto isosmótico de las especies (Thurberg *et al.*, 1973; Frank y Robertson, 1979; Nugegoda y Rainbow, 1989; Johnson y Jones, 1990). Al respecto, Hansen *et al.* (1992) señalan que el incremento de la toxicidad de los metales pesados en bajas salinidades, se debe al incremento en la biodisponibilidad e incorporación debido a cambios en la especiación del metal; a la disminución en las interacciones competitivas de los iones metálicos con el magnesio y el calcio por los sitios de transporte iónico y al efecto del metal en los mecanismos responsables del mantenimiento de las concentraciones iónicas y osmóticas del organismo. Por lo tanto, la evaluación de la toxicidad del cadmio y del zinc en los juveniles de *P. setiferus* en la salinidad considerada como óptima, permitió evitar interferencias de la salinidad con la toxicidad de los metales.

En los crustáceos decápodos, la mayor toxicidad del cadmio y del zinc se asocia con su incorporación en forma iónica a través de las superficies corporales (Giesy *et al.*, 1980). Dado

que en los juveniles de *P. setiferus* todos los experimentos de toxicidad se efectuaron en una salinidad de 11 ‰ es posible suponer que una alta proporción de las concentraciones totales de cadmio (Whitfield *et al.*, 1981; Gardiner, 1974) y de zinc (USPA, 1980; Nugegoda y Rainbow, 1989; Rainbow *et al.*, 1993), se encontraban biodisponibles.

Mortalidad

En los organismos acuáticos, la sensibilidad a los metales pesados está relacionada con la actividad biológica del metal. El zinc es un elemento esencial que es regulado homeostáticamente no así el cadmio que es un metal sin función biológica conocida y de mayor toxicidad (Rainbow y White 1989; Rainbow *et al.*, 1993). En este contexto y conforme a lo esperado, los valores de la concentración letal media (CL_{50-96 h}) del cadmio (0.99 mg/L) y del zinc (43.87 mg/L) en los juveniles de *P. setiferus*, demuestran que la toxicidad del cadmio fue mayor que la del zinc (44 veces). Este comportamiento también ha sido señalado en algunos crustáceos estuarinos y marinos (Tabla 17).

La sensibilidad al cadmio de *P. setiferus* fue mayor que en los juveniles de la misma especie de la Laguna de Tamiahua, Ver. (Espina y Vanegas, 1996), lo cual puede ser debido al incremento de la toxicidad del metal en bajas salinidades en los organismos utilizados en el presente estudio (Hansen *et al.*, 1992). Asimismo, los camarones fueron más sensibles al efecto tóxico del metal que otras especies de crustáceos decápodos estuarinos y marinos. En cambio *P. setiferus* fue más tolerante que los camarones estuarinos *C. Septemspinosa*, *P. vulgaris* y *P. longicarpus* (Tabla 17).

Por otra parte, la toxicidad del zinc en *P. setiferus* fue notoriamente menor que la obtenida en algunas especies marinas de crustáceos decápodos (Tabla 17). La mayor tolerancia de los camarones al zinc, puede atribuirse a un mayor requerimiento biológico del metal o bien ser reflejo de su historia previa, toda vez que en los sistemas lagunares-estuarinos las

concentraciones ambientales de zinc al igual que otros metales esenciales, son regularmente mas elevadas que en los ambientes marinos (Patin, 1982).

Tabla 17. Concentración letal media (CL50-96 h) del cadmio y del zinc (mg/L) para algunos crustáceos marinos y estuarinos.

Metal	T, °C	S, ‰	CL50-96 h	Autor
Cd				
<i>Penaeus setiferus</i>	24	20	0.99	Este estudio
<i>Penaeus setiferus</i>	25	25	3.04	Espina y Vanegas, 1996
<i>Penaeus aztecus</i>	25	25	1.32	Espina y Vanegas, 1996
<i>Penaeus duorarum</i>	25	20	4.60	Bahner y Nimmo, 1975
<i>Penaeus merguensis</i>	20	20	1.85	Denton y Burdon-Jones, 1982
<i>Penaeus japonicus</i>	25	38	5.5	Bambang <i>et al.</i> , 1995
<i>Crangnon septemspinosa</i>	20	20	0.30	Eisler, 1971
<i>Palaemonetes vulgaris</i>	20	20	0.40	Eisler, 1971
<i>Pagurus longicarpus</i>	20	20	0.30	Eisler, 1971
<i>Mysidopsis bahia</i>	26.5	20	0.016	Nimmo <i>et al.</i> , 1978
<i>Callinectes sapidus</i>	21	15	4.70	Frank y Robertson, 1979
<i>Callinectes sapidus</i>	21	35	11.60	Frank y Robertson, 1979
<i>Callinassa australiensis</i>	19	35	6.3	Ahsanullah <i>et al.</i> , 1981a
<i>Allorchestes compressa</i>	20.5	34.5	0.2-0.4	Ahsanullah, 1976
<i>Palaemon sp.</i>	19.5	35.5	6.6	Ahsanullah, 1976
Zn				
<i>Penaeus setiferus</i>	24	20	43.87	Este estudio
<i>Callinassa australiensis</i>	19	35	10.20	Ahsanullah <i>et al.</i> , 1981a
<i>Allorchestes compressa</i>	20.5	34.5	0.6	Ahsanullah, 1976
<i>Palaemon sp.</i>	19.5	35.5	11.3	Ahsanullah, 1976

En los crustáceos, la información relacionada con el efecto tóxico letal de los metales pesados evaluados de manera aislada es numerosa; sin embargo, son escasos los estudios que abordan el efecto de sus interacciones. En los sistemas acuáticos, los metales pesados al igual que todos los contaminantes ocurren en mezclas; las concentraciones son regularmente mucho menores que las evaluadas en este estudio aunque pueden presentarse en episodios agudos de contaminación accidental (McCahon y Pascoe, 1990).

La evaluación del efecto tóxico de la exposición aguda a las mezclas de cadmio y zinc en *P. setiferus*, se basó en el concepto de "unidad de toxicidad" (UT) el cual permitió determinar el tipo de interacción ejercido por la mezcla de los metales. En este sentido, se ha establecido que al evaluar la acción conjunta de contaminantes en una cierta razón de toxicidad (RT), los valores de UT_{50} mayores que la unidad reflejan el efecto antagónico de los tóxicos en las mezclas; cuando la UT_{50} es igual a la unidad el efecto es aditivo y cuando es menor que ésta, es sinérgico (Lloyd, 1961; Sprague y Ramsay, 1965).

Acorde a lo anterior, en los juveniles de *P. setiferus* el efecto tóxico de la mezcla de cadmio y zinc fue sinérgico, ya que en todos los tiempos de exposición (48, 72 y 96 h) la UT_{50} fue mayor que la unidad en ambas razones de toxicidad (RT) de la mezcla (1:1 y 2.3:1). La acción sinérgica del cadmio y del zinc en los camarones, fue notoria al observar el incremento considerable de la toxicidad de las mezclas en relación con los valores obtenidos de la CL_{50} de cada metal. Cabe señalar que las concentraciones de cadmio y zinc, en las mezclas en las cuales se obtuvo el 50 % de mortalidad (UT_{50} -96 h), fueron menores que las CL_{20} -96 h obtenidas en las pruebas de toxicidad de cada metal. Es evidente que en mezclas, el cadmio potencia la toxicidad del zinc, la cual aumenta al elevarse la RT de la mezcla de 1:1 a 2.3:1. Estos resultados reflejan la complejidad de la interacción de los metales cuya acción tóxica, en los juveniles de *P. setiferus*, se relaciona con la proporción de los metales en las mezclas. Es posible suponer que el aumento de la toxicidad de las mezclas sea debido a que cada uno incrementa la acumulación del otro, como ha sido señalado en varios crustáceos decápodos (Ahsanullah *et al.*, 1981a; Negilski *et al.*, 1981). La interacción sinérgica del cadmio y el zinc también ha sido observada en el camarón marino *Callinassa australiensis* (Negilski *et al.*, 1981). En cambio, en el camarón de agua dulce *Paratya tasmaniensis*, la acción conjunta de los metales es estrictamente aditiva (Thorp y Lake, 1974).

La mortalidad observada por la exposición crónica de los juveniles de *P. setiferus* al cadmio y al zinc, demuestran claramente el incremento en su toxicidad al aumentar el período de exposición. Las concentraciones empleadas fueron equivalentes a las que produjeron menos del

5 % de mortalidad en las pruebas de toxicidad aguda y sin embargo provocaron hasta un 15% de mortalidad al etenderse el tiempo de exposición. De igual manera, el efecto sinérgico de la mezcla de los metales en la exposición crónica fue mucho mayor que en exposiciones agudas. Así, no es posible extrapolar los resultados de pruebas de toxicidad aguda para estimar la toxicidad a largo plazo de estos contaminantes, como ha sido mencionado por Kraak *et al.* (1994).

Cabe destacar que la mortalidad observada en los camarones durante la exposición crónica al zinc fue similar a la registrada por efecto del cadmio, en concentraciones que produjeron el 1% de la muerte de los especímenes en las exposiciones agudas (0.05 mg Cd/L y 0.26 mg Zn/L). Los resultados contrastan con lo señalado por Kraak *et al.* (1994) quienes mencionan que durante la exposición crónica, los efectos de los metales no esenciales se incrementan más que los de los esenciales, lo cual comprueban en el bivalvo *Dreissena polymorpha* por la exposición individual al plomo y al zinc. Por lo tanto, a partir de los resultados obtenidos en los camarones, es posible afirmar que este comportamiento no puede ser generalizado ya que la toxicidad del metal esencial aparentemente es especie-específica y depende en gran medida del efecto tóxico particular del metal esencial en cuestión.

Bioacumulación

La toxicidad de los metales pesados en los organismos acuáticos está relacionada con los mecanismos de incorporación y de excreción, los cuales determinan la bioacumulación de los tóxicos; por lo tanto, las alteraciones biológicas (a nivel bioquímico, celular o fisiológico) y en última instancia la muerte de los individuos es el resultado directo de la acumulación de los metales debido al deterioro en los procesos de desintoxicación y excreción (Giesy *et al.*, 1980; Ahsanullah y Williams, 1991; Rainbow *et al.*, 1993).

En los juveniles de *P. setiferus* expuestos durante 21 días al cadmio y al zinc, la mortalidad no está relacionada directamente con la bioacumulación de los metales. Lo anterior es evidente al considerar que las mortalidades registradas por la exposición aislada a cada metal fueron similares (11-15 %), independientemente del aumento en la concentración externa de cada metal y de la magnitud de la acumulación corporal del cadmio y del zinc.

La bioacumulación del cadmio en los camarones, se relacionó con las concentraciones externas; el mayor contenido del metal ($33.7 \mu\text{g g}^{-1}$ PS) se registró en los organismos expuestos a 0.14 mg/L . Sin embargo, dicha acumulación no fue lineal y aparentemente tendió a la saturación a medida que se incrementaron los niveles de cadmio en el medio. Este comportamiento también ha sido señalado en *Procambarus acutus acutus* (Giesy *et al.*, 1980) y en la tilapia *Oreochromis mossambicus* (Pelgrom *et al.*, 1994), expuestos a concentraciones subletales del metal. El incremento en la acumulación corporal del cadmio a medida que aumenta su concentración en el medio, ha sido ampliamente documentada en los crustáceos decápodos (Vernberg *et al.*, 1974; Giesy *et al.*, 1980; Rainbow y White, 1989 y Rosas *et al.*, 1989).

Por otra parte, es posible afirmar que los juveniles de *P. setiferus*, regulan las concentraciones corporales de zinc entre 52 y $57 \mu\text{g g}^{-1}$ PS al ser expuestos a niveles ambientales hasta de 0.26 mg/L . Al respecto, Rainbow y White (1989) señalan que la capacidad de regulación corporal del Zn y del Cu, es exclusivo de los crustáceos decápodos; el intervalo de concentraciones ambientales en las cuales se mantiene dicha regulación, es especie-específica. En este sentido, el mantenimiento de los niveles corporales de zinc entre 0.70 y $0.90 \mu\text{g g}^{-1}$ PH ha sido reportado en *Procambarus acutus acutus* expuesto durante 24 días en 0.05 y 0.10 mg/L del metal (Giesy *et al.*, 1980); asimismo, *Palaeomon elegans* regula los niveles corporales en 80 a $90 \mu\text{g g}^{-1}$ PS al ser expuesto durante 21 días en 0.1 mg/L de zinc; en concentraciones mayores a 0.20 mg/L , se alteran los mecanismos de regulación y se inicia la acumulación neta (White y Rainbow, 1982). Los juveniles de *P. setiferus* regulan la concentración corporal del zinc en concentraciones ambientales mayores a las señaladas en otros crustáceos, lo cual podría definirla como una especie relativamente tolerante a la exposición crónica al metal.

White y Rainbow (1984 a y b) demostraron que la regulación corporal de zinc en *Palaemon elegans*, se debe principalmente al incremento de la tasa de excreción del metal al aumentar su incorporación, lo cual permite mantener constantes los niveles corporales del metal. Los mecanismos asociados con la desintoxicación del metal incluyen la producción metabólica de gránulos inertes de fosfato de zinc y su eliminación por heces y orina (White y Rainbow 1984 a y b), el enlace del ión metálico a metalotioneínas (Khan *et al.*, 1989; Viarengo y Canesi, 1991; Jonnalagada y Prasada, 1993) y la eliminación del metal por la exuvia (Renfro *et al.*, 1975). En *P. setiferus*, los resultados indican que la muda constituye un mecanismo eficaz de desintoxicación del zinc lo cual explicaría la regulación corporal del metal.

En los camarones expuestos al cadmio también se observó eliminación por la exuvia, si bien el patrón difiere al señalado para el zinc; los resultados sugieren que esta vía no constituye un mecanismo eficiente de desintoxicación dada la bioacumulación corporal en los camarones. Dicho mecanismo, sin embargo, permitiría reducir las concentraciones internas del metal lo cual disminuiría su efecto tóxico.

Las vías de eliminación del Cd y Zn en otros crustáceos, difieren al observado en *P. setiferus*. En *Palaemonetes pugio*, el cadmio se elimina a través de la muda mientras que el Zn se une a las metalotioneínas de las células de los tejidos corporales (Khan *et al.*, 1989). En contraste, en *Elasmopus rapax* (Zanders y Rojas, 1991) y en *Procambarus acutus acutus* (Giesy *et al.*, 1980) el cadmio no es eliminado mediante el exoesqueleto.

En los juveniles de *P. setiferus* fue notorio el efecto de la interacción del cadmio y zinc sobre la bioacumulación de los metales y su eliminación a través de la exuvia, procesos que presentaron diferentes patrones dependiendo de la RT de los metales en las mezclas. En los camarones expuestos en una RT 1:1, los niveles corporales de cadmio no se modificaron significativamente al aumentar las concentraciones del metal en el medio. Una probable explicación es que las concentraciones de zinc en las mezclas (0.548 y 0.877 mg/L) inhibieron la acumulación del cadmio o bien que, a los niveles de cadmio presentes en las mezclas (0.012 y 0.020 mg/L) otros

mecanismos de excreción, permitieron mantener bajas las concentraciones corporales del metal. Cabe recordar que no se registró la eliminación del cadmio a través de la muda. Aparentemente en *P. setiferus* la inducción de la eliminación del cadmio ocurre sólo hasta que se alcanzan concentraciones mayores que las umbrales (Cearly y Coleman, 1974). En contraste, la bioacumulación del zinc fue mayor al aumentar las concentraciones de los metales en el medio, aunque no fue posible establecer si la presencia del cadmio promovió la acumulación de éste.

El efecto sinérgico de los metales fue notorio al exponer los camarones en mezclas en RT 2.3:1, donde la bioacumulación del Cd y Zn se relacionó con la pérdida de los mecanismos de desintoxicación a través de la exuvia. En este sentido, el cadmio potenció la incorporación del zinc y a su vez el zinc promovió, en menor medida, la acumulación del cadmio. Así, en presencia de niveles bajos de cadmio (0.014 mg/L) la acumulación corporal del zinc se incrementó drásticamente aún en concentraciones de 0.263 mg Zn/L en la mezcla, similares a las que en la exposición aislada al metal (0.26 mg Zn/L) los camarones mantuvieron la regulación corporal del zinc. De tal manera, la pérdida de la regulación del zinc en los juveniles de *P. setiferus* por la exposición a la mezcla de los metales tanto en RT 1:1 como en 2.3:1, podría atribuirse al incremento en la tasa de incorporación por una parte y a la alteración en la tasa de excreción del metal por otra; lo anterior ha sido señalado en otros decápodos por White y Rainbow (1982) y Johnson (1988), entre otros.

Cabe señalar que la mortalidad de los camarones por la exposición crónica a los metales en mezclas con RT de 1:1, se debió fundamentalmente al efecto tóxico del zinc incorporado. En contraste, el notorio incremento en la mortalidad de los organismos al aumentar la RT de las mezclas en 2.3:1, obedeció al efecto sinérgico del Cd y Zn acumulado en los tejidos. Por lo tanto, los resultados reflejan nuevamente la complejidad del efecto tóxico en los juveniles de *P. setiferus* por la interacción de los metales, el cual depende de la RT de los metales en la mezcla. Al respecto, Pelgrom *et al.* (1994) obtienen resultados similares en *Oreochromis mossambicus* en los que la acumulación y la toxicidad de la acción conjunta de concentraciones subletales de

Cd y Cu está relacionada con la razón de los metales en las mezclas. La interacción sinérgica del cadmio y del zinc en la bioacumulación y la toxicidad de los metales, también ha sido mencionada en el camarón marino *Callinassa australiensis* (Ahsanullah *et al.*, 1981b);

Balance Hidrosalino

En los crustáceos acuáticos, el efecto tóxico de los metales pesados está relacionado fundamentalmente con el deterioro estructural y funcional de las branquias, las cuales desempeñan un papel fundamental en el intercambio gaseoso, el intercambio iónico, el balance ácido-base, la excreción nitrogenada y la regulación corporal de agua. La pérdida de la integridad fisiológica de los organismos por efecto de los tóxicos, está relacionada por una parte con la alteración en los procesos respiratorios como la ventilación y la perfusión, el intercambio respiratorio, el transporte de oxígeno y la respiración celular (Spicer y Weber, 1991) así como por las alteraciones en los mecanismos de osmorregulación (Pequeux, 1995).

En el presente estudio, la presión osmótica de la hemolinfa, la actividad de la $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPasa, los niveles de cloruro plasmático y el contenido corporal de agua se utilizaron como indicadores del balance hidrosalino de los camarones. Cabe recordar que los juveniles de *P. setiferus* se mantuvieron en la salinidad ($11 \pm 1\%$) correspondiente a su punto isosmótico. Por lo tanto, en los camarones del grupo testigo, los valores de las respuestas evaluadas dan cuenta del balance hidrosalino normal de los especímenes en condiciones de isosmoticidad.

Frecuentemente se menciona en la literatura que el cadmio altera la actividad de las $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPasas branquiales, deteriorando la osmorregulación en los crustáceos acuáticos. Por ejemplo, en *Scylla serrata*, concentraciones subletales del metal inhiben drásticamente la actividad de las ATPasas en branquia, causando incrementos en los electrolitos plasmáticos, Na^+ , K^+ y Cl^- en la hemolinfa (Dhavale *et al.*, 1988). La elevación en la presión osmótica y iónica por efecto del cadmio, también ha sido señalado en *Carcinus maenas* (Thurberg *et al.*,

1974) y en *Cancer magister* y *Hemigrapsus nudus* (Caldwell, 1974). En cambio, el metal disminuyó la presión osmótica en el isópodo *Idotea neglecta* (Jones, 1975) y en los juveniles de *Penaeus japonicus* (Bambang *et al.*, 1995) alterando la osmorregulación de los especímenes.

Al término del período de exposición crónica al cadmio en los juveniles de *P. setiferus*, la presión osmótica, la actividad de la $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPasa branquial y los niveles de cloruro plasmático, no fueron modificados por el metal. Así, contrario a lo esperado, concentraciones de 0.05 y 0.16 mg Cd/L no alteran de manera evidente el comportamiento osmótico de los camarones. Estos resultados permiten suponer que en la salinidad correspondiente al punto isosmótico, la acción tóxica del cadmio en los camarones no fue evidente o bien fue enmascarada.

A diferencia del cadmio, la exposición crónica al zinc produjo una disminución significativa de la presión osmótica, la cual puede ser explicada por la evidente reducción del cloruro plasmático. Cabe señalar que la actividad de la $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPasa branquial, responsable del transporte activo del Na^+ y el K^+ no fue modificada por el metal; por lo tanto, es posible suponer el mantenimiento de las concentraciones internas de estos iones.

En general, en los crustáceos acuáticos la captación del Cl^- en las branquias posteriores se lleva a cabo fundamentalmente por el intercambio iónico $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$. El bicarbonato es producto de la reacción reversible $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \xrightleftharpoons{\text{RC}} \text{H}_2\text{CO}_3 \rightleftharpoons \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$, catalizada por la anhidrasa carbónica. Esta enzima desempeña por lo tanto un papel crucial en el intercambio iónico; de hecho, se ha observado una fuerte correlación entre la actividad de la anhidrasa carbónica y el transporte del Cl^- en las branquias de crustáceos (Pequeux, 1995). Así, en los juveniles de *P. setiferus* es posible suponer que el zinc inhibe la actividad de la anhidrasa carbónica de la cual es componente integral y por lo tanto altera el intercambio $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ provocando una disminución del ión en hemolinfa, como ha sido sugerido en *Eriocheir sinensis* intoxicado con mercurio (Pequeux, 1995).

La acción tóxica del zinc en la regulación iónica y osmótica ha sido documentada en algunos crustáceos. En *Crangon crangon* y en *C. maenas*, los niveles de Na^+ y Cl^- no son afectados por concentraciones subletales de zinc y de cobre (Johnson, 1988). En *Gammarus duebeni*, en salinidades cercanas al punto isosmótico, concentraciones de 0.005 a 0.2 mg Zn/L no alteran la presión osmótica de la hemolinfa de los camarones; sin embargo en concentraciones mayores (0.5 mg/L) es evidente la alteración en la capacidad osmorreguladora observándose una disminución tanto en la presión osmótica de la hemolinfa como en la concentración interna de sodio (Johnson y Jones, 1990). Asimismo, en los isópodos marinos *Idotea baltica* e *I. neglecta*, la exposición durante 120 h a 10 mg Zn/L no modifica la presión osmótica de los organismos; en cambio en 20 mg Zn/L ésta disminuye significativamente (Jones, 1975). El deterioro en el comportamiento osmótico, se ha relacionado con la alteración de la estructura branquial de los especímenes.

Los resultados del presente trabajo sugieren que en los juveniles de *P. setiferus*, la mezcla de los metales en RT de 1:1 y 2.3:1, provocan severas alteraciones en los mecanismos que regulan la concentración de los electrolitos del medio interno de los camarones. Así, la actividad de la Na^+-K^+ ATPasa branquial fue inhibida significativamente por la acción conjunta del cadmio y el zinc. La mayor reducción se observó en la mezcla con RT 2.3:1 y en la mayor UT, de 0.025. En tal condición, el cadmio aún en bajas concentraciones alteró drásticamente la función enzimática, lo cual puede ser debido a que el metal en la mezcla estimula el efecto tóxico del zinc.

La inhibición de la actividad enzimática de la Na^+-K^+ ATPasa branquial y el evidente incremento en la presión osmótica del medio interno por efecto de la interacción de los metales, sugiere el deterioro de la regulación iónica y el incremento en los electrolitos en la hemolinfa de los camarones, como ha sido señalado por Dhavale *et al.* (1988). Sin embargo, este incremento no está asociado con los niveles de Cl^- ya que es evidente la reducción del cloruro plasmático. Por lo tanto, el aumento de la presión osmótica podría ser debido al incremento en la hemolinfa de otros electrolitos osmoefectores (K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , NH_4^+ , aminoácidos libres). La participación

de estos electrolitos ha sido documentada en los camarones peneidos al ser mantenidos en salinidades menores al punto isosmótico, en las cuales presentan un comportamiento hiperregulador (Regnault, 1987). Asimismo, la alteración en los iones plasmáticos también se puede asociar con la alteración en la estructura branquial de los camarones (Bubel, 1976; Spicer y Weber, 1991; Pequeux, 1995).

En referencia al balance hídrico de los juveniles de *P. setiferus*, el cadmio produjo una pequeña pero significativa deshidratación la cual no puede ser explicada, dado que la presión osmótica no fue modificada por el metal. La discrepancia de estos resultados también ha sido mencionada en *Oreochromis mossambicus* expuesta a concentraciones subletales de Cd y Cu (Pelgrom *et al.*, 1974). En los camarones, el zinc no modificó el contenido corporal de agua. Así, es posible suponer en *P. setiferus* el zinc no altera la permeabilidad corporal de los juveniles de *P. setiferus* como ha sido mencionado en *Gammarus duebeni* expuesto a concentraciones subletales del metal (Johnson y Jones, 1990). Sin embargo, en los camarones expuestos a la mezcla de los metales en las diferentes RT ocurre deshidratación, lo cual sugiere el efecto sinérgico del cadmio con el zinc; en estas condiciones, la relación entre el deterioro de la permeabilidad corporal y la alteración de la regulación iónica y osmótica, depende de la RT del metal en la mezcla. Al respecto, Pelgrom *et al.* (1994) mencionan resultados similares en *O. mossambicus* por la interacción de concentraciones subletales de Cd y Cu en diferentes razones de toxicidad.

Cabe señalar que en los camarones expuestos de manera aislada al zinc, la alteración en el balance hidrosalino se observó en concentraciones en las cuales se mantiene la regulación corporal del metal. Los resultados difieren a los obtenidos en *Palaemon elegans* (White y Rainbow, 1982), *Crangon crangon* y *Carcinus maenas* (Johnson, 1988) expuestos a concentraciones subletales de Cu y de Zn en los cuales la osmorregulación fue alterada sólo en concentraciones mayores a las umbrales, en las cuales los niveles corporales de cada metal ya no están regulados; los efectos tóxicos detectados se atribuyeron a la bioacumulación de los metales. Por lo tanto, es posible suponer que en los juveniles de *P. setiferus* la acción tóxica del

zinc sobre el balance hídrico opera de manera independiente a los mecanismos involucrados en la regulación de los niveles corporales del metal. En cambio en los camarones expuestos a las mezclas de cadmio y de zinc fue evidente el deterioro de la regulación corporal del zinc; así, la alteración en la regulación iónica e hídrica de los especímenes puede atribuirse a la bioacumulación de los metales.

Balance energético

En los juveniles de *P. setiferus*, el cadmio, el zinc, de manera aislada o en mezclas, alteraron en diversa magnitud las respuestas fisiológicas que conforman el balance energético de los camarones. La alteración más evidente se relacionó con la disminución significativa en la tasa de ingestión por efecto del cadmio y de las mezclas de los metales. En contraste, el zinc no modificó dicha tasa. La inhibición en la ingestión de alimento por efecto de concentraciones subletales de cadmio y zinc, también ha sido documentada en otros crustáceos (Reeve *et al.*, 1977; Maltby y Nylor, 1990; Gaudy *et al.*, 1991; Wong, 1992).

Frecuentemente, la disminución en la incorporación del alimento se atribuye a la reducción de la actividad relacionada con la adquisición del alimento. Sin embargo, aunque en *P. setiferus* no fue posible cuantificar la actividad locomotora, fue evidente el incremento en la actividad de los organismos expuestos al cadmio y a sus mezclas, no así por efecto del zinc, condición en la cual la reducción notoria en la actividad locomotora no influyó la tasa de ingestión. Por lo tanto, el efecto de la acción tóxica del cadmio, aislado y en mezclas, se puede atribuir a la inhibición de los quimiorreceptores involucrados en la detección e incorporación del alimento, debido a un efecto narcótico, como ha sido señalado en el pez *Coho salmon* por el efecto del Hg, Cu (Rehnberg y Schreck, 1986). En bivalvos, la disminución en la tasa de ingestión del alimento también ha sido atribuida al efecto narcótico del Cd, Cu y Zn (Smith, 1985; Lin *et al.* 1992).

Es importante destacar que la reducción observada en la tasa de ingestión de los juveniles de *P. setiferus*, fue independiente del incremento de los metales en el medio y de su acumulación corporal. Este comportamiento también ha sido señalado en el bivalvo *Dreissena polymorpha* en los que si bien la disminución en la tasa de filtración por la exposición crónica a la acción conjunta del Pb y el Zn está determinada por la concentración de cada metal en la mezcla, no se relaciona con el incremento de los niveles corporales de los metales (Kraak *et al.*, 1994). Estos resultados contrastan con los obtenidos en algunos crustáceos y bivalvos por el efecto de metales pesados, en los que la disminución en el alimento ingerido se asocia con el incremento en la incorporación de los tóxicos (Moore *et al.*, 1984; Maltby y Nylor, 1990; Widdows *et al.*, 1990; Wong, 1992).

En los organismos acuáticos, la asimilación del alimento ingerido se relaciona de manera directa con la eficiencia con la cual se absorben los componentes dietéticos (Condrey *et al.*, 1972). En crustáceos, la eficiencia de asimilación (U') está más relacionada con la composición química del alimento que con la cantidad ingerida (I); asimismo, dietas con un bajo contenido de cenizas son asimilados más eficientemente que aquellas con un contenido elevado. Dicha eficiencia, también se relaciona con la actividad y la concentración de las enzimas digestivas (Conover, 1966; Condrey *et al.*, 1972; Rosas, 1989). En el presente estudio, a los juveniles de *P. setiferus* se les suministró alimento balanceado con un contenido de 37 % de proteína y con fracciones de materia orgánica y cenizas de 92 y 8 % (Anexo 3). Por lo tanto, la elevada eficiencia de asimilación (80 al 81 %) se puede atribuir a la composición química y a la baja proporción de cenizas en el alimento. Esta eficiencia es comparable al señalado para juveniles de *P. aztecus* y de *P. setiferus* (Condrey *et al.*, 1972; Vanegas, 1992) en ambientes controlados no contaminados, aunque menores que el señalado para juveniles de *P. setiferus* del medio natural (Foreman, 1983).

En *P. setiferus*, el cadmio produjo una disminución en la energía asimilada similar a la observada en la energía ingerida (I). Lo anterior se atribuye a que el metal no modificó la

eficiencia con la cual el alimento ingerido fue asimilado. En los organismos expuestos al zinc, la eficiencia de asimilación y en consecuencia la asimilación del alimento ingerido no fueron alterados. A diferencia de otros crustáceos (Gaudy *et al.*, 1991; Torreblanca *et al.*, 1991), los resultados obtenidos en *P. setiferus* también sugieren que el cadmio y el zinc no modifican de manera evidente la capacidad y la eficiencia del aparato enzimático involucrado en la asimilación de los componentes dietéticos. Sin embargo, es probable que en los camarones expuestos a la interacción de los metales, el deterioro de estos mecanismos sean responsables de la reducción observada en la eficiencia de absorción del alimento y en consecuencia de la asimilación del alimento ingerido. La disminución en las tasas de ingestión y asimilación en *P. setiferus* expuestos al cadmio y a las mezclas de los metales, contribuyen a limitar el suministro de energía al organismo. En consecuencia, estas alteraciones nutricionales reducen la energía disponible para sus funciones metabólicas y en última instancia disminuyen la capacidad de crecimiento de los camarones.

El consumo de oxígeno es una medida indirecta del metabolismo aerobio y refleja las reacciones que producen energía para cubrir las funciones globales del organismo; de tal manera, se considera una medida de integración sencilla que da cuenta de la condición fisiológica de los especímenes (Fry, 1971). El cadmio, el zinc y sus mezclas produjeron un incremento significativo en la tasa respiratoria de los camarones. Este incremento puede tener severas consecuencias ya que decrece el campo metabólico limitando el desempeño fisiológico de los camarones y reduciendo la energía útil para crecimiento somático.

Los efectos del cadmio en la tasa metabólica de los crustáceos son contradictorios. Así, concentraciones subletales del metal pueden inhibir el metabolismo (Thurberg *et al.*, 1973; Vernberg *et al.*, 1974; Depledge, 1984; Gaudy *et al.*, 1991), no modificarlo (Spicer and Weber, 1991) o incrementarlo (Espina y Vanegas, 1995). Tales discrepancias pueden estar relacionadas con las diferentes etapas de acción tóxica de los metales pesados la respuesta fisiológica del organismo como lo señala Gaudy *et al.* (1991). En la primera etapa la intoxicación por cadmio

incrementa la demanda de ATP y por ende la fosforilación oxidativa; este incremento se considera una respuesta adaptativa relacionada con mecanismos compensatorios a la intoxicación por el metal. En la segunda etapa de intoxicación severa, disminuye la tasa respiratoria debido a la incapacidad del organismo de responder a las demandas del incremento de ATP que en última instancia lo conduce a la muerte.

Se ha sugerido que la disminución en la tasa respiratoria por efecto de los metales pesados se debe al deterioro estructural de la superficie funcional de la branquia y por ende a la alteración en la captación, transferencia y transporte de oxígeno a los tejidos, así como a la inhibición de las enzimas involucradas en la respiración celular (Spicer y Weber, 1991). Por otra parte, el incremento en el metabolismo respiratorio frecuentemente se ha relacionado con una mayor demanda energética debido a alteraciones en el equilibrio iónico y osmótico de los organismos por estresores ambientales, incluidos los metales pesados (Pequeux, 1995).

En los juveniles de *P. setiferus* expuestos al cadmio, al zinc y a la mezcla de los metales, el incremento en la tasa metabólica sugiere la participación de mecanismos de compensación en los procesos respiratorios que demandan gasto energético. Al respecto, el aumento en la ventilación branquial y en la frecuencia cardíaca ha sido señalado en *C. maenas* expuesto al Cu y Hg (Depledge, 1984); en *Callinectes similis* el cadmio también aumenta la tasa de extracción de oxígeno (Ramírez *et al.*, 1989). El incremento en la tasa metabólica de *P. setiferus* por efecto del cadmio, puede reflejar además la participación de mecanismos de desintoxicación como el aumento en la síntesis de metalotioneínas, que contribuye a disminuir la acción tóxica del metal (Viarengo y Nott, 1993).

Las alteraciones en la tasa respiratoria provocadas por concentraciones subletales de los metales pesados, dependen en gran medida de la naturaleza y de la eficiencia de los mecanismos de regulación y desintoxicación (Johnson, 1988). En este sentido, el aumento en el metabolismo respiratorio de los camarones expuestos al zinc, también se puede relacionar con el costo energético de la regulación interna del metal y con la energía invertida en la eliminación del

zinc a través de la exuvia. Asimismo, puede ser consecuencia de una mayor demanda energética por la alteración en el balance hidrosalino de los camarones. Este comportamiento ha sido señalado en *Crangon crangon* y *Carcinus maenas* por niveles subletales de Cu y Zn (Johnson, 1987) en los que, a diferencia de lo ocurrido en *P. setiferus*, la alteración en la tasa metabólica y en el balance hidrosalino se relaciona con el deterioro en la regulación corporal de los metales.

El incremento en la respuesta respiratoria por la acción conjunta del cadmio y del zinc también se puede atribuir, al deterioro en el balance hidrosalino producido por los metales bioacumulados y al gasto energético del incremento en la síntesis de metalotioneínas, como fue señalado previamente. Sin embargo, es importante destacar el aumento notorio en la mortalidad de los camarones expuestos en RT 2.3:1 de las mezclas. En esta condición es posible suponer que los organismos se encuentran en el límite de la compensación fisiológica donde su sobrevivencia depende del tiempo de exposición a los tóxicos, como ha sido señalado por Espina y Vanegas (1996).

En los camarones peneidos el principal producto de excreción es el amonio el cual representa del 50 al 90 % del nitrógeno derivado del catabolismo de las proteínas incorporadas en el alimento (Regnault, 1987). La tasa de producción amoniaca se ha relacionado frecuentemente con la disponibilidad del alimento en función tanto a la cantidad del alimento ingerido como a la composición química de la dieta suministrada. En este sentido, la relación directa entre la cantidad del alimento ingerido y la tasa de excreción nitrogenada ha sido documentada en diversas especies (Nelson *et al.*, 1977; Nelson *et al.*, 1979; Zúñiga *et al.*, 1984; Cockcroft y McLachlan, 1987; Regnault, 1987).

En los juveniles de *P. setiferus*, el cadmio no modificó la producción amoniaca aunque la tasa de ingestión del alimento disminuyó al incrementarse el metal en el medio. El zinc, no alteró ninguna de las tasas. Sin embargo, la acción conjunta de los metales inhibió significativamente la excreción nitrogenada la cual se puede atribuir, por una parte, a la reducción en la

incorporación del alimento suministrado a los camarones. El efecto de los metales pesados en la excreción nitrogenada de los crustáceos es contradictoria. En el anfípodo *Leptomysis lingvura* expuesto al cadmio, la inhibición en la tasa de excreción se relaciona con la reducción en el alimento ingerido (Gaudy *et al.*, 1991); en *Carcinus maenas*, el metal incrementa dicha tasa aunque la incorporación del alimento permanece constante o disminuye (Amiard *et al.*, 1982). En contraste, en los copépodos *Pseudocalanus* sp. y *Calanus* sp. el Cu no la modifica si bien la tasa de ingestión del alimento es deprimida (Reeve *et al.*, 1977). Tales discrepancias se pueden atribuir al efecto de los metales pesados sobre la actividad enzimática involucrada tanto en la degradación proteica como en el proceso de deaminación y transaminación y en consecuencia en la formación de amonio.

La degradación proteica en los crustáceos tiene lugar en el hepatopáncreas, principal sitio de formación del amonio (Al-Mohanna y Nott, 1986; 1987). En este órgano se registra la mayor bioacumulación en los crustáceos expuestos a los metales pesados, incluidos el cadmio y el zinc (Bjerregard, 1990; Weeks y Rainbow, 1992). En los juveniles de *P. setiferus* expuestos a la acción conjunta del cadmio y del zinc, es evidente el incremento en la acumulación corporal, es particular de zinc. Por lo tanto es posible inferir el efecto tóxico de los metales en la alteración del catabolismo proteico así como en la inhibición de los sistemas enzimáticos involucrados en la formación de amonio, como ha sido señalado por Gaudy *et al.* (1991). Asimismo, al considerar la acción tóxica de los metales en el balance hidrosalino de los camarones, es posible suponer que la disminución en la excreción nitrogenada también sea reflejo de la participación del amonio (NH_4^+) como electrolito osmoefector (Pequeaux, 1995).

Ahora bien, en los camarones peneidos al igual que en todos los artrópodos, la formación del exoesqueleto es una parte integral del crecimiento. Sin embargo, se considera una pérdida energética ya que es eliminada cuando ocurre la muda. De manera obvia, el crecimiento se asocia con la pérdida y renovación periódica del exoesqueleto (Bliss, 1977; Horst y Freeman, 1993). En *P. setiferus*, la energía perdida a través de la exuvia no fue modificada por el cadmio, el zinc o sus mezclas. Lo anterior se atribuye por una parte, a que el contenido energético de la

exuvia no fue modificada independientemente de su contenido metálico, lo cual sugiere que los metales no modifican su composición orgánica. Cabe recordar que en los camarones la muda constituye una ruta importante de eliminación de los metales, en particular del zinc. Por otra parte, la frecuencia de muda de los especímenes no fue modificada por los metales. La muda en crustáceos, es un proceso complejo regulado hormonalmente vía el sistema glándula sinusal-órgano Y y cuya coordinación determina la frecuencia de muda. Sin embargo, a partir de los resultados obtenidos no es posible establecer si el cadmio y el zinc ejercen acción tóxica en este proceso.

Ahora bien, en los organismos amoniotéticos, la integración de la tasa respiratoria y la excreción nitrogenada en la razón atómica O/N es una medida de integración simple, empleada para describir la naturaleza del sustrato metabolizado como fuente energética (Clifford y Brick, 1983; Dall y Smith, 1986; Mayzaud y Conover, 1988). Valores teóricos mínimos entre 3 y 16 se asocian con el catabolismo estricto de proteínas; valores entre 50 y 60 reflejan igual oxidación de proteínas y lípidos mientras, valores mayores reflejan el catabolismo de lípidos y carbohidratos (Mayzaud y Conover, 1988). La razón O/N puede relacionarse tanto con los requerimientos energéticos como con los efectos de las variables ambientales, incluidos los contaminantes, que modifican los procesos fisiológicos integrados en la razón motivo por el cual ha sido considerado un indicador general de estrés. (Bayne *et al.*, 1973; Widdows, 1978).

En los juveniles de *P. setiferus*, los valores de la razón O/N (7) reflejaron el empleo exclusivo de proteínas como sustrato energético. Estos resultados coinciden con los estudios sobre las estimaciones de los requerimientos dietéticos de proteína efectuados en camarones peneidos, donde se sugiere que la mayoría de las especies utilizan los aminoácidos como el principal sustrato metabolizado con fines energéticos (Gaxiola, 1994; Chen y Nan, 1993; Rosas *et al.*, 1995). Aunque en los juveniles de *P. setiferus* la exposición al Cd, al Zn y a la mezcla de los metales incrementó significativamente la razón O/N, los valores obtenidos (11 a 20) reflejan la utilización de las proteínas como principal fuente de energía metabólica. Por lo tanto, independientemente de las alteraciones causadas por los metales pesados en la tasa respiratoria

y en la excreción nitrogenada los valores de la razón O/N sugieren que las proteínas de la dieta sustentan los requerimientos energéticos de los camarones aún en condiciones de severo estrés fisiológico como en los organismos expuestos a las mezclas de los metales en RT 2.3:1. De tal manera, los resultados sugieren que en los juveniles de *P. setiferus* la razón atómica O/N no es un índice adecuado que refleje la magnitud del efecto tóxico de la exposición crónica al cadmio, al zinc y a sus mezclas. Resultados similares son reportados en *Thais lima*, donde la exposición crónica a hidrocarburos no modifican la razón atómica O/N independientemente de las alteraciones fisiológicas observadas (Stickle *et al.*, 1984).

En los juveniles de *P. setiferus*, los efectos tóxicos ocasionados por los metales en las diferentes respuestas fisiológicas evaluadas se reflejan en última instancia en dos aspectos fundamentales: la sobrevivencia y el crecimiento. De tal manera, los modelos bioenergéticos que resumen la energía disponible para el crecimiento son adecuados para evaluar el deterioro ocasionado en la integridad fisiológica de los organismos, por los contaminantes (Rice, 1990). En este sentido, el campo de crecimiento refleja el efecto global de la exposición a los tóxicos ambientales, incluidos los metales pesados. Por esta razón, la energía potencial de crecimiento se considera una integración compleja que es útil como indicador general de estrés (Widdows *et al.*, 1990; Viarengo y Canesi, 1991).

La evaluación del campo de crecimiento de los juveniles de *P. setiferus* expuestos al cadmio, al zinc y a sus mezclas, y su relación con la acumulación corporal de los metales en función de las concentraciones externas, permitió establecer la relación causa-efecto de la acción tóxica de cada metal y de sus interacciones. La reducción en la energía potencial de crecimiento de los camarones por efecto del cadmio y del zinc se relacionó con el aumento de las concentraciones de los metales en el medio y en el caso del cadmio, también con el incremento en la bioacumulación del metal. En cambio, en los camarones expuestos al zinc, la disminución en la EPC no se asoció con la incorporación del metal ya que éste fue regulado internamente. En los camarones expuestos a la acción conjunta del cadmio y del zinc, el efecto adverso se reflejó en la disminución del campo de crecimiento, pero en esta condición, asociada con la

bioacumulación de ambos metales. Cabe recordar que el cadmio, aún en bajas concentraciones impulsa la bioacumulación de zinc. La relación inversa entre el crecimiento y la acumulación corporal de los metales, también ha sido mencionada en *Gammarus pulex* por efecto del Zn (Maltby y Nylor, 1990) y en *Uca pugilator* expuesto al Hg (Vemberg *et al.*, 1977).

La reducción en el campo de crecimiento de los camarones (P) por la acción tóxica de los metales es consecuencia tanto de las alteraciones en la energía contenida en el alimento ingerido (I) como en la distribución de la energía asimilada (A) a los diversos procesos fisiológicos de los organismos. Tales alteraciones se visualizan de manera esquemática en la Figura 17.

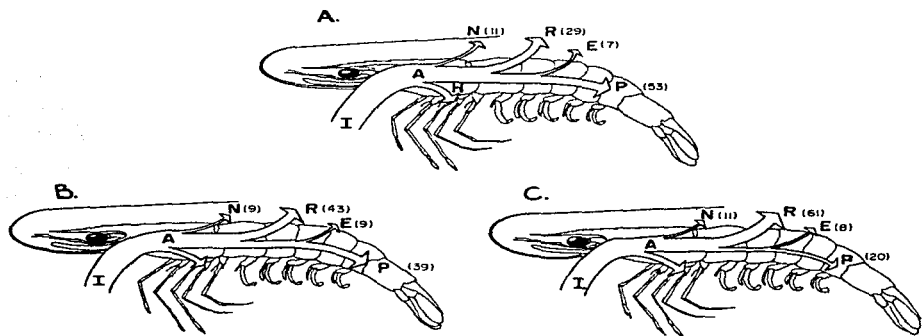


Fig. 17. Representación esquemática de la distribución de la energía ingerida (I) y asimilada (A) en los principales componentes del balance energético de los juveniles de *P. setiferus* del grupo testigo (A), expuestos al cadmio (B) y a las mezclas de cadmio y zinc en RT 2.3:1 (C): energía perdida a través de las heces (H; calculado de I-A), la excreción nitrogenada (N) y la exuvia (E); energía invertida en la respiración (R) y disponible para el crecimiento (P). El tamaño de las flechas reflejan la proporción de la energía ingerida destinada a cada proceso. En paréntesis se incluye la proporción de la energía asimilada involucrada en cada proceso.

En los camarones expuestos al zinc, la disminución en la EPC es consecuencia fundamentalmente, del incremento en la energía invertida en la respuesta respiratoria (R) dado que tanto la energía incorporada en el alimento (I) como la que fue asimilada (A) no fue modificada por el metal. Sin embargo, en los camarones expuestos al cadmio de manera aislada (Fig. 17 B) y en interacción con el zinc (Fig. 17 C) la disminución en la energía potencial de crecimiento se atribuye a la disminución significativa de la energía incorporada en el alimento (I) y al incremento en la fracción de la energía asimilada empleada en la respiración (R); tales alteraciones fueron más drásticas al aumentar la razón de toxicidad de los metales en las mezclas. Así, en los camarones expuestos en RT 2.3:1, la notoria reducción en el campo de crecimiento se atribuye al deterioro global de su integridad fisiológica, lo cual se tradujo en una mayor mortalidad. Cabe señalar que las pérdidas energéticas asociadas con la excreción amoniacal y la exuvia (E), no modificaron sustancialmente la energía canalizada al campo de crecimiento.

De manera general, la reducción en el campo de crecimiento de los juveniles de *P. setiferus* obedece al efecto tóxico del cadmio y del zinc sobre dos aspectos fundamentales: la limitación nutricional relacionada tanto con la disminución en la incorporación y asimilación del alimento ingerido y el incremento en el metabolismo energético. Estos resultados contrastan con lo obtenido en *Gammarus pulex* expuesto al zinc donde la reducción en el campo de crecimiento es consecuencia, exclusivamente, de la inhibición en la tasa de ingestión del alimento (Maltby y Nylor, 1990). La relación directa entre la inhibición en la incorporación del alimento y la reducción en el campo de crecimiento, también ha sido documentada en otros invertebrados marinos por efecto de hidrocarburos y de metales pesados (Stickle *et al.*, 1989; Moore *et al.*, 1984; Widdows *et al.*, 1990).

Ahora bien, la distribución tanto de la energía contenida en el alimento ingerido (I) como de la fracción asimilada de éste (A) hacia cada uno de los procesos fisiológicos proporciona una mayor información sobre la eficiencia de utilización de esta energía, máxime cuando se refiere a

las eficiencias de crecimiento bruta (K_1) y neta (K_2). La eficiencia de crecimiento se refiere a la capacidad del organismo de transformar el alimento ingerido y utilizarlo como fuente de materiales y energía en la síntesis de tejido somático, en condiciones determinadas (Klekovsky y Duncan, 1975). Así, la eficiencia será alta si con un mínimo de la energía contenida en el alimento ingerido o asimilado, el crecimiento del organismo es óptimo.

En los juveniles de *P. setiferus* mantenidos a la temperatura del medio y en condiciones de isosmoticidad, las eficiencias de crecimiento bruta (42 %) y neta (53 %) fueron mayores que las obtenidas en juveniles de *P. aztecus* en condiciones controladas, óptimas, (33 y 40% respectivamente) (Vanegas, 1992) pero menores que las de *P. setiferus* de ambientes naturales (61 % y 86 %) (Foreman, 1983). Tanto el cadmio como el zinc redujeron las eficiencias de crecimiento (K_1 y K_2) de los camarones expuestos por 21 días a concentraciones subletales de los metales. El zinc provocó una disminución ligeramente mayor que el cadmio. Sin embargo, la magnitud del efecto de cada metal fue similar tanto en altas como en bajas concentraciones. En los camarones, la exposición de 15 días a la mezcla de los metales en RT 1:1 ocasionó una ligera reducción tanto en K_1 como en K_2 . Al aumentar la RT en 2.3:1, la disminución en las eficiencias de crecimiento fue drástica, reflejo de la interacción sinérgica de los metales. En esta condición, es notorio el deterioro en la capacidad de *P. setiferus* de convertir el alimento ingerido y asimilado en tejido corporal.

Cabe señalar que en todas las condiciones experimentales, el cadmio el zinc y sus mezclas incrementaron significativamente la energía invertida en la respiración, disminuyendo por lo tanto la energía potencial de crecimiento de los juveniles de *P. setiferus* y reduciendo en consecuencia las eficiencias de crecimiento (K_1 y K_2). Widdows *et al.* (1990) mencionan resultados similares en *Mytilus edulis* por efecto de hidrocarburos y metales pesados.

En los estudios ecotoxicológicos, el objetivo fundamental es evaluar y predecir los efectos causados por las sustancias químicas y otros estresores ambientales en el ecosistema, considerando que los efectos acumulados a nivel organismo tienen proyección a nivel de poblaciones, comunidades y ecosistemas. Así una condición en la cual los organismos sobreviven pero se reduce la efectividad de sus funciones, repercute en la dinámica de organización biológica inmediata, esto es a nivel de poblaciones (Moriarty, 1988). Por lo tanto, la alteración en el equilibrio energético de los organismos puede tener efecto a largo plazo en la estabilidad de las poblaciones al modificarse el potencial de la especie en términos de crecimiento y de reproducción (Widdows *et al.*, 1990; Calow, 1990; Gaudy *et al.*, 1991).

Los resultados obtenidos en este estudio no permiten efectuar una extrapolación directa a las poblaciones naturales de *P. setiferus*, debido al control de las variables experimentales en contraste con la interacción compleja y dinámica de éstas en el medio. En cambio, es posible afirmar que la presencia de metales pesados como el cadmio y el zinc en el medio altera el equilibrio energético de los camarones lo cual comprometería la estabilidad de las poblaciones.

CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos en las exposiciones agudas a los metales es evidente que los juveniles de *P. setiferus* son mucho más sensibles al cadmio que al zinc, lo cual se relaciona con la actividad biológica de los metales; el zinc, es un metal esencial regulado internamente por los organismos, no así el cadmio que es un metal sin función biológica conocida y de mayor toxicidad. En mezclas, la acción conjunta de los metales es sinérgica y el efecto depende de la razón de toxicidad en la que se encuentran .

En concentraciones subletales, la toxicidad de cada metal depende no sólo del tiempo de exposición sino de la acción tóxica particular de cada uno. Lo anterior es evidente ya que los camarones regulan los niveles corporales de zinc hasta concentraciones de 0.26 mg/L, en la cual la mortalidad es similar a la observada por la exposición al cadmio. En los juveniles de *P. setiferus*, la acción tóxica del cadmio se incrementa en las mezclas con el zinc. Así, las alteraciones biológicas observadas se deben a la interacción compleja de ambos metales.

En *P. setiferus*, la bioacumulación del cadmio se relaciona con las concentraciones externas. En contraste, en los camarones expuestos al zinc se observa la regulación interna del metal la cual se puede atribuir en parte, a la eliminación por la exuvia; la muda es considerada una vía eficiente de desintoxicación del metal. En los camarones expuestos a la acción conjunta del cadmio y del zinc, la bioacumulación de ambos se relacionó con la RT de los metales en la mezcla y con el deterioro del proceso de desintoxicación.

Los resultados obtenidos en relación al balance hidrosalino de los camarones por efecto del cadmio, del zinc y de sus mezclas sugieren una modificación importante en los mecanismos de intercambio iónico y en consecuencia en la regulación iónica y osmótica, así como en la permeabilidad corporal de los especímenes. El deterioro observado difiere cuando los metales se encuentran aislados o en mezclas.

Las alteraciones observadas en los procesos de ingestión, asimilación, respiración, excreción y exuvia, permiten afirmar que el cadmio, el zinc y sus mezclas ejercen su acción tóxica a diferentes niveles y modifican en diversa magnitud las respuestas fisiológicas. Tales alteraciones no necesariamente se relacionan con las concentraciones de los metales en el medio ni con la acumulación corporal. La evaluación del campo de crecimiento a través del balance energético proporcionó una medida integradora del deterioro funcional de los camarones, producido por la acción individual de cada metal y por su acción conjunta.

En este sentido, la disminución de la energía potencial de crecimiento de los camarones expuestos al cadmio fue producto de la reducción en la energía incorporada por el alimento y el incremento en la energía invertida en la respiración, independientemente del aumento en la bioacumulación del metal. En contraste, el zinc no alteró la energía incorporada por el alimento por lo que la reducción en el campo de crecimiento se atribuye al incremento en las demandas energéticas, asociadas con la regulación corporal del metal. La reducción provocada por las mezclas de los metales, fue consecuencia de la disminución en las tasas de ingestión y de asimilación del alimento, así como al aumento del consumo de oxígeno. La reducción más evidente en la energía potencial de crecimiento se observó en los camarones expuestos a la mezcla de los metales en RT mayor (2.3:1); esto es consecuencia del incremento en la acumulación corporal de los metales, lo cual se tradujo en una mayor mortalidad. Así, las respuestas que reflejan la condición global de los organismos como el campo de crecimiento, son índices de estrés muy importantes y de gran sensibilidad para evaluar el efecto de los metales pesados, en concentraciones subletales.

Debido al efecto tóxico del cadmio, del zinc y de sus mezclas, también las eficiencias de crecimiento bruta y neta (K_1 y K_2) de los camarones disminuyeron, lo cual es reflejo de la reducción de la capacidad de los organismos de transformar la energía incorporada en el alimento incorporado en tejido somático.

Los resultados obtenidos permiten profundizar y ampliar el conocimiento del efecto tóxico del cadmio, del zinc y de sus interacciones en los juveniles de *P. setiferus*. Se destaca la necesidad de evaluar el efecto de los contaminantes mediante la utilización de índices de estrés que permitan la integración del deterioro funcional del organismo. De igual manera se subraya la importancia de combinar el análisis de los tóxicos en los tejidos y la evaluación de las alteraciones biológicas producidas en el marco de la energética fisiológica, con el fin de establecer la relación causa-efecto de los contaminantes.

LITERATURA CITADA

- Ahsanullah, M. 1976. Acute toxicity of zinc and cadmium to seven invertebrate species from Western Port, Victoria. *Aust. J. Mar. Freshwater. Res.* 27: 187-196.
- Ahsanullah, M., D.S. Negilski and C. Mobley. 1981a. Toxicity of zinc, cadmium and copper to the shrimp *Callinassa australiensis*. I. Effects of individual metals. *Mar. Biol.* 64: 299-304.
- Ahsanullah, M., D.S. Negilski and C. Mobley. 1981b. Cadmium and copper to the shrimp *Callinassa australiensis*. III. Accumulation of metals. *Mar. Biol.* 64: 311-316.
- Ahsanullah M. and A.R. Williams. 1991. Sublethal effects and bioaccumulation of cadmium, chromium, copper and zinc in the marine amphipod *Allochertes compressa*. *Mar. Biol.* 109: 59-65.
- Al-Mohanna S.Y. and J.A. Nott. 1987. R-cells and the digestive cycle in *Penaeus semisulcatus* (Crustacea:Decapoda). *Mar. Biol.* 95: 129-137.
- Al-Mohanna S.Y. and J.A. Nott. 1987. B-cells and digestion in the hepatopancreas of *Penaeus semisulcatus* (Crustacea:Decapoda). *J. Mar. Biol. Ass. U. K.* 66: 403-414.
- Amiard, T.C., C. Amiard-Triquet, C. Denuit. 1982. Variations de l'activité de quelques enzymes de l'hémolymphe et de l'hépatopancreas de *Carcinus maenas* in situ et expérimentalement sous l'effet de polluants métalliques (Cd, Pb, Cu et Zn). *Publ. Cent. Natn. Exploit. Océans* (CNEXO). 14: 385-398.
- Ames, B.N. 1966. Assay of inorganic phosphate, total phosphate and phosphatases. *Meth. Enzym.* 8: 115-118.
- APHA. American Public Health Association. 1985. *Standard Methods for Examination of Water and Wastewater*. 16 Ed. Washington, D.C. 1268 pp.
- Bambang, Y., G. Charmantier, P. Thuot and J.P. Trillers. 1995. Effect of cadmium on survival and osmoregulation of various developmental stages of the shrimp *Penaeus japonicus* (Crustacea:Decapoda). *Mar. Biol.* 123: 443-450.
- Bayne, B. 1973. Aspects of the metabolism of *Mytilus edulis* under starvation. *Netherl. J. Sea Res.* 7: 399-410.
- Bayne, B., L., D.L. Holland, M.N. Moore, D.M. Lowe and J. Widdows. 1978. Further studies on the effects of stress in the adult *Mytilus edulis*. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.* 58: 825-841.
- Bishop, J.M., J.G. Gosselink and J.H. Stone. 1980. Oxygen consumption and hemolymph osmolality of brown shrimp *Penaeus aztecus*. *Fish. Bull.* 78 (3): 741-747.
- Bjerregaard, P. 1990. Influence of physiological condition on cadmium transport from hemolymph to hepatopancreas in *Carcinus maenas*. *Mar. Biol.* 106: 199-209.
- Bjerregaard P. and M.H. Depledge. 1994. Cadmium accumulation in *Littorina littorea*, *Mytilus edulis* and *Carcinus maenas*: the influence of salinity and calcium ion concentrations. *Mar. Biol.* 119: 385-395.
- Botello, A.V. and F. Manedlli. 1978. Distribution of n-paraffins in sea-grasses, benthic algae, oysters and recent sediments from Terminos Lagoon, Campeche, Mexico. *Bull. Environm. Contam. Toxicol.* 19 (2): 162-170.
- Botello, A.V. y S. Villanueva. 1988. La contaminación y procesos geoquímicos en la Laguna de Términos, Campeche, México. (Memoria) Ecología de los ríos Usumacinta y Grijalva.

- Instituto Nacional de Investigación sobre Recursos Bióticos. División Regional Tabasco. 770 pp.
- Botello, A.V., G.P. Velez, A. Toledo, G. Diaz-Gonzalez y S. Villanueva. 1992. Ecología, recursos costeros y contaminación en el Golfo de México. *Ciencia y Desarrollo*. 17: 28-48.
- Brown, V.M., V.V. Mitrivic and G.T.C. Siark. 1968. Effects of chronic exposure to zinc on toxicity of a mixture of detergent and zinc. *Water Res.* 2: 255-263.
- Bubel, A. 1976. Histologica; and electron microscopical observations on the effects of different salinities and heavy metal ions on the gills of *Jaena nordmani* (Rathke), Crustacea, Decapoda, Isopoda. *Cel. Tissue. Res.* 167: 65-96.
- Cadwell, R.S. 1974. Osmotic and ionic regulation in decapod crustacea exposed to methoxychlor. p. 197-223. In: F.J. Verneberg and W. Vernberg (Eds.). *Pollution and physiology of marine organisms*. Academic Press, N.Y.
- Calow, P. and R.M. Sibly. 1990. A physiological basis of population processes: ecotoxicological implications. *Func. Ecol.* 4: 283-288.
- Castille, F.L. and A.L. Lawrence. 1981. The effect of salinity on the osmotic, sodium and chloride concentrations in the hemolymph of euryhaline shrimp of the genus *Penaeus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 68: 75-80.
- Chen, J.C. and F.H. Nan. 1993. Changes of oxygen consumption and ammonia-n excretion by *Penaeus chinensis* Osbeck at different temperature and salinity levels. *J. Crust. Biol.* 13 (4): 706-712.
- Clifford H.C. III and R.W. Brick. 1983. Nutritional physiology of freshwater shrimp *Macrobrachium rosenberguii* (De Man). I. Substrate metabolism in fasting juvenile shrimps. *Comp. Biochem. Physiol.* 74A: 561-568.
- Cockcroft, A.C. and A. McLachlan. 1987. Nitrogen regeneration by the surf zone penaeid prawn *Macropetasma africanus*. *Mar. Biol.* 96: 343-348.
- Condrey, R.E., J.G. Gosselink and H.J. Bennet. 1972. Comparison of the assimilation of different diets by *Penaeus setiferus* and *Penaeus aztecus*. *Fish. Bull.* 70: 1281-1291.
- Conover, R.J. 1966. Assimilation of the organic matter by zooplankton. *Limnol. Oceanog.* 11: 346-354.
- Cuvin-Aralar, M.A. and E. Aralar. 1993. Effects of long-term exposure to a mixture of cadmium, zinc and inorganic mercury on two strains of tilapia *Oreochromis niloticus* (L.). *Bull. Environm. Contam. Toxicol.* 50: 891-897.
- Dall, W. and D.M. Smith. 1986. Oxygen consumption and ammonia-N Excretion in fed and starved tiger prawn *Penaeus esculentus* Haswell. *Aquaculture*. 55: 23-33.
- Dawirs, R. 1983. Respiration, energy balance and development during growth and starvation of *Carcinus maenas* L. Larvae (Decapoda:Portunidae). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 59: 105-128.
- Denton G.R. and C. Burden-Jones. 1982. The influence of temperature and salinity upon the acute toxicity of heavy metals to the banana prawn (*Penaeus merguensis* de Man). *Chemy Ecol.* 1: 131-143.
- Depledge, M.H. 1984. Disruption of circulatory and respiratory activity in shore crabs (*Carcinus maenas* L.) exposed to heavy metal pollution. *Comp. Biochem. Physiol.* 78 C (2): 445-459.

- Dhavalé, D., V.B. Masurekar and B.A. Giridhar. 1988. Cadmium induced inhibition of Na^+/K^+ ATPase activity in tissues of crab *Scylla serrata* (Forskál). *Bull. Environm. Contam. Toxicol.* 40: 759-763.
- Díaz, F., S. Espina, C. Rosas, A. Sanchez, C. Vanegas y E. Díaz-Iglesia. 1989. Ritmo respiratorio y amplitud metabólica del camarón café *Penaeus aztecus* (Tamiagua, México) con ablación de los pedunculos oculares. *Rev. Inv. Mar. Univ. Habana, Cuba.* 10(11): 27-40.
- Eisler, R. 1971. Cadmium poisoning in *Fundulus heteroclitus* (Pisces: Cyprinodontidae) and other marine organisms. *J. Fish. Res. Bd. Can.* 28: 1225-1234.
- Elliot, J.M. and W. Davison. 1975. Equivalents of oxygen consumption in animal energetics. *Oecologia.* 19: 195-201.
- Escobar, E. y L.A. Soto. 1989. Los misidáceos (Crustacea:Peracarida) epibénticos de Laguna de Términos, Campeche: distribución, notas ecológicas y clave taxonómica ilustrada para su identificación. *An. Inst. Biol. Univ. Nat. Autón. México. Ser. Zool.* 59(1): 29-43.
- Espina, S., A. Muñoz, R. Villalobos, F. Díaz, J. Latourneric y A. Sánchez. 1976. Metabolismo respiratorio y osmococoncentración en dos especies de peneidos de la Laguna de Mandinga, Ver. México. p. 27-50, In: Mem. del Symposium sobre Biología y Dinámica Poblacional de Camarones. Guaymas, Sonora. Agosto 8-13.
- Espina, S. y C. Vanegas. 1996. Ecotoxicología y Contaminación. p. 69-106, *Err: Botello, A.V., J.L. Rojas-Galaviz, J.A. Benítez-Torres y D.Z. Zárate-Lomeli (Eds.). Golfo de México, Contaminación e Impacto Ambiental. Diagnóstico y Tendencias. EPOMEX Serie Científica 5. UACH-SEP. Campeche, México.* 666 pp.
- Foreman, V.E. 1983. The ecology of *Penaeus setiferus*: habitat selection, carbon and nitrogen metabolism and simulation modeling. Thesis of Doctor of Physiophy. University of Georgia. 151 pp.
- Frank P.M. and P.B. Robertson. 1979. The influence of salinity on toxicity of cadmium and chromium to the blue crab *Callinectes sapidus*. *Bull. Environm. Contam. Toxicol.* 21: 74-78.
- Fry, F.E.J. 1971. The effect of environmental factors on the physiology of fish. p. 1-98. In: Hoar W.S. and D.J. Randall (Eds.). *Fish Physiology*. Vol. VI. Academic Press. N.Y.
- García, E. 1964. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Koppen (para adaptarlo a las condiciones de la República Mexicana). Offset Larios, S.A. México, D.F. 187 pp.
- García-Cubas, A. 1981. Moluscos de un sistema lagunar tropical en el sur del Golfo de México (Laguna de Términos, Campeche). *Inst. Cienc. Mar y Limnol. Univ. Nat. Autón. México. Publ. Esp.* 5: 1-182.
- Gardiner, J. 1974. The chemistry of cadmium in natural ware. I. A study of cadmium complex formation using the cadmium specific-ion electrode. *Wat. Res.* 8: 22-30.
- Gaudy, R., J.P. Guerin and P. Keranbrum. 1991. Sublethal effects of cadmium on respiratory metabolism, nutrition, excretion and hydrolase activity in *Leptomysis lingvura* (Crustacea:Mysidacea). *Mar. Biol.* 109: 493-501.

- Gaxiola, G. 1994. Requerimientos nutricionales de las postlarvas de *Penaeus setiferus* y *P. duorarum* (Crustacea: Penaeidae). Tesis de Grado de Doctor en Ciencias. Facultad de Ciencias. UNAM. 110 pp.
- Giesy J.P., J.W. Bowling and H.J. Kania. 1980. Cadmium and zinc accumulation by freshwater crayfish. *Arch. Environm. Contam. Toxicol.* 9: 683-697.
- Goldberg, D.E., M. Koide, V. Hodge, F.A. Rusell and J.H. Martin. 1983. U.S. Mussel Watch: 1977-1978. Results on trace metals and radionucleotides. *Est. Coast. and Shelf Sci.* 16: 69-93.
- Gracia, A. 1989. Ecología y pesquería del camarón blanco *Penaeus setiferus* (Linnaeus, 1767) en la Laguna de Términos-Sonda de Campeche. Tesis de Doctorado en Ciencias (Biología). Facultad de Ciencias, UNAM. 127 pp.
- Gracia, A. and L. Soto. 1990. Populations study of the penaeid shrimp of Terminos Lagoon, Campeche, Mexico. *An. Inst. Cienc. Mar y Limnol. Univ. Nat. Auton. Mexico.* 17 (2): 241-255.
- Gutman, Y. and H.O. Bergmeyer. 1974. *Methods of enzymatic Analysis*. Vol III. Academic Press. N.Y. : 449-453
- Hansen, J.I., T. Mustafa and M. Depledge. 1992a. Mechanisms of copper toxicity in the shore crab *Carcinus maenas*. I. Effects on Na, K-ATPase activity, haemolymph electrolyte concentrations and tissue water contents. *Mar. Biol.* 114: 253-257.
- Horts, M. and J. Freeman. 1993. *Crustacean integument. Morphology and Biochemistry*. CRC Press. London. 230 pp.
- Ivlev, V.S. 1939. Energy balance of carps. *Zool. Zhur.* 18: 303-318.
- Johnson, I. 1988. The effects of combinations of heavy metals, hypoxia and salinity on ion regulation in *Crangon crangon* (L.) and *Carcinus maenas* (L.). *Comp. Biochem. Physiol.* 91 C (2): 459-463.
- Johnson, I.T. and M. B. Jones. 1990. Effect on osmoregulation of *Gammarus duebeni* (Crustacea; Amphipoda) from the estuary and the sewage treatment works at Looe, Cornwall. *Ophelia.* 31 (3): 187-196
- Jonnalagadda S.B. and P.V. Prasada Rao. Toxicity, bioavailability and metal speciation. 1993. Mini Review. *Comp. Biochem. Physiol.* 106 C (3): 585-595.
- 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.
- Kahn, A.T., J.S. Weiss and L. D'Andrea. 1989. Bioaccumulation of four heavy metals in two population of grass shrimp, *Palaemonetes pugio*. *Bull. Environm. Contam. Toxicol.* 42: 339-343.
- Klekowsky, R.Z. and A. Duncan. 1975. Physiological approach to ecological energetics. p. 15-64. In: Grodinsky, W., R.Z. Klekowsky and A. Duncan (Eds.). *Methods for Ecological Bioenergetics*. Blackwell Sci. Publ. Oxford.
- Kraak, M., Y. Wink, S. Stuijzand, M. Buckert-de Jong, C. de Groot and W. Admiraal. 1994. Chronic ecotoxicity of Zn and Pb to the zebra mussel *Dreissena polymorpha*. *Aq. Toxicol.* 30: 77-89.
- Kurmaly, K., A.B. Yule and D.A. Jones. 1989. An energy budget for the larvae of *Penaeus monodon* (Fabricius). *Aquaculture.* 81: 13-25.

- Lara-Domínguez A.L., A. Yanez-Arancibia y F. Amezcua-Linares. 1981. Biología y ecología del bagre *Arius melanopus* Gunther en la Laguna de Términos, sur del Golfo de México (Pisces:Ariidae). *An. Inst. Cienc. Mar y Limnol. Univ. Nat. Autón. México.* 8(1):267-304.
- Lin, W., A.R. Mitchel and P.K. Chien. 1992. The effects of copper, cadmium and zinc on particle filtration and uptake of glycine in the pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Comp. Biochem. Physiol.* 103C: 181-187.
- Logan, D.T. and C.E. Epifanio. 1978. A laboratory energy balance for the larvae and juveniles of the american lobsters *Homarus americanus*. *Mar. Biol.* 47: 381-389.
- Lowry O.R., N.J. Rosenbrough, A.L. Farr and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- Lloyd, R. 1961. The toxicity of mixtures of zinc and copper sulphates to rainbow trout *Salmo gairdneri* (Richardson). *Ann. Appl. Biol.* 49: 535-538.
- Magliette, R.J., F.G. Doherty, D. McKinney and E.S. Venkataramani. 1995. Need for environmental quality guidelines based on ambient freshwater quality criteria in natural waters. Case study "zinc". *Bull. Environm. Toxicol.* 54: 626-632.
- Maltby, L. and C. Nylor. 1990. Preliminary observations on the ecological relevance of *Gammarus* "scope for growth" assay: effect of zin on reproduction. *Func. Ecol.* 4: 393-397.
- Mancilla, P.M. y F.M. Vargas. 1980. Los primeros estudios sobre la circulación y el flujo neto del agua a través de la Laguna de Términos, Campeche. *Ann. Cienc. Mar. y Limnol. Univ. Nat. Autón. México.* 7: 1-12.
- Mayzaud, P. and R.J. Conover. 1988. O:N atomic ratio as a tool to describe zooplankton metabolism. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 45: 289-302.
- McCahon C.P. and D. Pascoe. 1990. Episodic pollution: causes, toxicological effects and ecological significance. *Func. Ecol.* 4: 375-383.
- McFarland, W.N. and B.D. Lee. 1963. Osmotic and ionic concentrations of penaeidean shrimps of the Texas coast. *Bull. Mar. Sci. Gulf Carib.* 13: 391-417.
- Moore, K.A. and R.L. Wetzel. 1988. The distribution and Productivity of seagrass in the Terminos Lagoon Ecological characterization of Terminos Lagoon. Chap. 4: 207-220 pp. In: Yanez-Arancibia, A. and J.W. Day, Jr. (Eds.). *Ecology of Coastal Ecosystems in the Southern Gulf of Mexico: The Terminos Lagoon Region*. Inst. Cienc. del Mar y Limnol. UNAM. Coast. Ecol. Inst. LSU. Editorial Universitaria, México, D.F.
- Moore, M.N., J. Widdows, J.J. Cleary, R.K. Pipe, P.N. Salked, P. Donkin, S.V. Farrar, S.V. Evans and P.E. Thompson. 1984. Responses of the mussel *Mytilus edulis* to copper and phenanthrene: interactive effects. *Mar. Environm. Res.* 14: 167-183.
- Moriarty, F. 1988. *Ecotoxicology. The study of pollutants in ecosystems*. Academic Press. N.Y. 289 pp.
- Negilski, D.S., M. Ahsanullah and M.C. Mobley. 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.
- Nelson, S.G., A.W. Knight and H.W. Li. 1977. The metabolic cost of food utilization and ammonia production by juvenile *Macrobrachium rosenbergii* (Crustacea:Palaemonidae). *Comp. Biochem. Physiol.* 57 A: 67-72.

- Nelson, S.G., H.W. Li and A.W. Knight. 1979. Caloric, carbon and nitrogen metabolism of juvenile *Machrobrachium rosebergii* (De Man) (Crustacea, Palaemonidae) with regard to trophic position. *Comp. Biochem. Physiol.* 58A: 319-327.
- Niagru, J.O. and J.B. Sprague. 1987. *Cadmium in the Aquatic Environment*. John Wiley and Sons. N.Y. 271 pp.
- Nimmo, D.R., R.A. Rigby, L.H. Bahner and J.M. Sheppard. 1978. The acute and chronic effects of cadmium on the estuarine mysid *Mysidopsis bahia*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 7: 80-85.
- Nugegoda, D. and P.S. Rainbow. 1989. Salinity, osmolality and zinc uptake in *Palaemon elegans* (Crustacea:Decapoda). *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 55: 149-157.
- Oadken, J.M., J.S. Oliver and A.R. Flegal. 1984. EDTA chelation and zinc antagonism with cadmium in sediment: effects on the behaviour and mortality of two infaunal amphipods. *Mar. Biol.* 84: 125-130.
- Paez-Osuna, F., D. Valdez, H.M. Alexander, H. Fernandez-Perez y J. Osuna-Lopez. 1987. Níquel y plomo en las fracciones disuelta y particulada del sistema fluvio-lagunar de la Laguna de Términos, México. *An. Inst. Cienc. Mar y Limnol. Univ. Nat. Autón. México.* 14 (1): 79-86.
- Paez-Osuna, F., G. Izaguirre-Fierro, R.I. Godoy-Meza, F. Gonzalez-Farías y J.I. Osuna-Lopez. 1988. Metales pesados en cuatro especies de organismos filtradores de la región costera de Mazatlán: Técnicas de extracción y niveles de concentración. *Contam. Ambient.* 4: 33-41.
- Patin, S.A. 1982. *Pollution and the Biological Resources of the Oceans*. Butterworth Scientific. London. 287 pp.
- Pelgrom, S.M., L.P. Lamers, J.A. Garritsen, B.M. Pels, R.A. Lock, P.H. Balm and S.E. Wendelarr. 1994. Interactions between copper and cadmium during single and combined exposure in juvenile tilapia *Oreochromis mossambicus*: influence of feeding condition on whole metal accumulation and the effect of the metals on tissue water and ion content. *Aquat. Toxicol.* 30: 117-135.
- Pequeux, A. 1995. Osmotic regulation in crustaceans. *J. Crust. Biol.* 15(1): 1-60.
- Phleger, F.B. and A. Ayala-Castanares. 1971. Processes and history of Terminos Lagoon, Mexico. *Am. Assoc. Petrol. Geol. Bull.* 55: 2130-2140.
- Ponce-Velez, G. y A. Botello. 1991. Aspectos geoquímicos y de contaminación por metales pesados en la Laguna de Terminos, Campeche. *Hidrobiología.* 1 (2): 1-10.
- Prosser, L. 1991. *Environmental and Metabolic Animal Physiology*. Wiley-Liss, Inc. Pub. New York. 578 pp.
- Rainbow P.S., I. Malik and O'Brien. 1993. Physicochemical and physiological effects on the uptake of dissolved zinc and cadmium by the amphipod crustacean *Orchestia gammarellus*. *Aquat. Toxic.* 25: 15-30.
- Rainbow P.S. and S.L. White. 1989. Comparative strategies of heavy metal accumulation by crustaceans: zinc, copper and cadmium in a decapod, an amphipod and a barnacle. *Hydrobiologia.* 174: 245-262.
- Ramírez, E. 1989. Programa de cómputo DORES. Cursos Regional sobre Ensayos Biológicos y Pruebas de Toxicidad. INDERENA/PAC/PNUMA/FAO/COI. Cartagena de Indias, Colombia.

- Ramírez, P., G. Barrera and C. Rosas. 1989. Effects of chromium and cadmium upon respiration and survival of *Callinectes similis*. *Bull. Environm. Toxicol.* 43: 850-857.
- Rand, G.M. and S. Petrocelli. 1984. *Fundamentals of Aquatic Toxicology. Methods and Applications*. Hemisphere Publishing Corporation. N.Y. 666 pp.
- Reeve, M.R., M.A. Walter, K. Darcy and T. Ikeda. 1977. Evaluation of potencial indicators of sub-lethal toxic stress on marine zooplankton (feeding, fecundity, respiration and ecretion): controled ecosystem pollution experiment. *Bull. Mar. Sci.* 27: 105-113.
- Rehnberg, B.C. and C.B. Scherck. 1986. Acute metal toxicology on olfaction in *Coho salmon*: behaviour, receptors and odor-metal complexation. *Bull. Environm. Contam. Toxicol.* 36: 579-586.
- Raz-Guzman, A. 1993. Caracterización trófica de los componentes dominantes de las comunidades bentónicas en Laguna de Términos, Campeche y en la plataforma continental adyacente. Tesis de Grado. Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM. México. 85 pp.
- Regnault, M. 1987. Nitrogen excretion in marine and fresh water crustacea. *Biol. Rev.* 62: 1- 4.
- Renfro W.C., S.W. Fowler, M. Heyraud and J. La Rosa. 1975. Relative importance of food and water in long-term zinc⁶⁵ accumulation of marine biota. *J. Fish. Res. Bd. Can.* 32: 1328-1339.
- Rice, J.A. 1990. Bioenergetics modeling approaches to evaluation of stress in fishes. p. 80-92. *In: Adams, S.M. (Ed.). Biological Indicators of Stress in Fish. American Fisheries Symposium 8. Bethesda, Maryland.*
- Roesijadi, G. 1992. Metallothioneins in metal regulation and toxicity in aquatic animals. *Aq. Toxicol.* 22: 81-114.
- Rosas, C., A. Sánchez, E. Díaz, L.A. Soto, G. Gaxiola, R. Brito, M. Baez and R. Pedroza. 1995. Oxygen consumption and ammonia excretion of *Penaeus setiferus*, *P. schmitti*, *P. duorarum* and *P. notialis* postlarvae fed purified testa diets: effect of protein level on substrate metabolism. *Aq. Liv. Res.* 18 (2): 17-25.
- Rosas, I., A. Baez and R. Belmont. 1993. Oyster (*Crassostrea virginica*) as indicator of heavy pollution in some lagoons of the Gulf of Mexico. *Wat. Air and Soil Poll.* 20: 127-135.
- Rosas, C., T. Castañeda y G. Barrera. 1989. Niveles de Pb, Cr y Cd en *Callinectes sapidus* y *C. similis* y su relación con la concentración de estos en el agua y en el sedimento. *Rev. Inv. Mar.* X (1): 71-88.
- Rosenberg R. and 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: 291-304.
- Sánchez, A.Z. 1979. Efecto de la salinidad y temperatura sobre el balance hidrosalino de los peneidos de la Laguna de Mandinga, Veracruz. Tesis de Licenciatura en Biología. Facultad de Ciencias. UNAM. México. 31 pp.
- Smith, J.R. 1985. Copper exposure and ciliary function in gill tissue of *Mytilus californianus*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 35: 556-563.
- Spicer, J.I. and R.E. Weber. 1991. Respiratory impairment in crustaceans and molluscs due to exposure to heavy metals. *Comp. Biochem. Physiol.* 100 C (3): 339-342.
- Sprague, J.B. and B.A. Ramsay. 1965. Lethal levels of mixed copper-zinc solutions for juvenils salmon. *J. Fish Res. Board. Can.* 22: 425-432.

- Stickle W.B., S.D. Rice and A. Moles. 1984. Bioenergetics and survival of the marine snail *Thais lima* during long-term oil exposure. *Mar. Biol.* 80: 281-189.
- Tentes, Y. and E. Stratakis. 1991. Partial purification and properties of (Na⁺ + K⁺)-ATPase from *Potamon potamios*. *Comp. Biochem. Physiol.* 100C (3): 619-624.
- Thurberg, F.P., M.A. Dawson and R.S. Collier. 1973. Effects of copper and cadmium on osmoregulation and oxygen consumption in two estuarine crabs. *Mar. Biol.* 23: 171-175.
- Thorp, V.J. and P.S. Lake. 1974. Toxicity bioassays of cadmium on selected freshwater invertebrates and the interaction of cadmium and zinc on the freshwater shrimp *Paratya tasmanlinisi*. *Aust. J. Mar. Freshwat. Res.* 25: 88-97.
- Thorp, J.P., J.P. Giesy and S. Wineriter. 1979. Effects of chronic cadmium exposure on crayfish survival, growth and tolerance to elevated temperatures. *Arch. Environ. Cont. Toxicol.* 8: 435-449.
- Torreblanca, A., J. Díaz-Mayans, J. Del Ramo and A. Nuñez. 1987. Oxygen uptake and gill morphological alterations in *Procambarus clarkii* (Girard) after sublethal exposure to lead. *Comp. Biochem. Physiol.* 86 C (1): 219-224.
- Torreblanca, A., J. Del Ramo and J.D. Díaz-Mayans. 1991. Effects of cadmium on the biochemical composition of the freshwater crayfish *Procambarus clarkii* (Girard, 1852). *Bull. Environm. Contam. Toxicol.* 47: 933-938.
- Tuckey, J.W. 1977. *Exploratory Data Analysis*. Addison-Wesley, Co. Massachusetts. 688 pp.
- UNEP/FAO/IAEA. 1986. Test of the acute lethal toxicity of pollutants to marine fish and invertebrates. *Reference Methods for Marine Pollution Studies*. No. 43 (Draft). UNEP. 23 pp.
- United States Environmental Protection Agency. 1979. The waters of Westernport Bay and catchment. No. W-28. 369-380.
- United States Environmental Protection Agency. 1980. Ambient quality for zinc. EPA/440/5-80-079.
- United States Environmental Protection Agency. 1989. *Short-term methods for estimating chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms*. 2nd. Edition. Environmental Monitoring Systems Laboratory. Cincinnati. 249 pp.
- Vanegas, C. 1992. Efecto de la salinidad y de la temperatura sobre el balance energético de juveniles del camaron café *Penaeus aztecus* Ives (Crustacea, Decapoda). Tesis de Grado en Biología. Facultad de Ciencias, UNAM. 85 pp.
- Vasquez, G.F., G.M. Sánchez and K.S. Virender. 1993. Trace metals in the oyster *Crassostrea virginica* of the Terminos Lagoon, Campeche, Mexico. Baseline. *Mar. Poll. Bull.* 24 (124): 398-399.
- Venkaratamiah, A., G.J. Lakshmi and G. Gunter. 1974. Studies on the effect of salinity and temperature on the comercial shrimp *Penaeus aztecus* Ives, with special regard to survival limits, growth, oxygen consumption and ionic regulation. Gulf Coast Research Laboratory Ocean Springs. Mississippi. 134 pp.
- Vernberg, W.B., P.J. DeCoursey and J. O'Hara. 1974. Multiple environmental factor effects on physiology and behaviour of the fiddler crab *Uca pugilator*. p. 381-425. In: F.J. Vernberg and F.B. Vernberg (Eds.). *Pollution and Physiology of Marine Organisms*. Academic Press, Inc. New York.
-

- White, S.L. and P.S. Rainbow. 1872. Regulation and accumulation of copper, zinc and cadmium by the shrimp *Palaemon elegans*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 8: 95-101.
- White S.L. and P.S. Rainbow. 1984a. The regulation of zinc concentration by *Palaemon elegans* (Crustacea:Decapoda): zinc flux and the effects of temperature, zinc concentration and moulting. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 16: 135-147.
- White, S.L. and P.S. Rainbow. 1984b. Zinc flux in *Palaemon elegans* (Crustacea:Decapoda): moulting, individual variation and tissue distribution. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 19: 153-166.
- Viarengo, A., G. Mancinelli, G. Martino, M. Pertica, L. Canesi and A. Mazzuxotelli. 1988. Integrated cellular stress indices in trace metal contamination: critical evaluation in a field study. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 46: 65-70.
- Viarengo, A. and L. Canesi. 1991. Mussels as biological indicators of pollution. *Aquaculture*. 94: 225-243.
- Viarengo, A. and J.A. Nott. 1993. Mechanisms of heavy metal cation homeostasis in marine invertebrates. Mini-Review. *Comp. Biochem. Physiol.* 104 C: 355-372.
- Villanueva, S. y A.V. Botello. 1992. Metales pesados en la zona costera del Golfo de México y Caribe Mexicano; una revisión. *Rev. Int. Contam. Amb.* 8(1): 47-61.
- Wang, S.Y. and W.B. Stickle. 1988. Biochemical composition of the blue crab *Callinectes sapidus* exposed to the water-soluble fraction of crude oil. *Mar. Biol.* 98: 23-30.
- Wassenberg, T.J. and Hill B.J. 1984. Moulting behaviour of the tiger prawn *Penaeus esculentus* (Haswell). *Aust. J. Mar. Freshwat. Res.* 35: 561-571.
- Watson, T.A. and F.W. Beamish. 1980. Effects of zinc on branchial ATPase activity *in vivo* rainbow trout *Salmo Gairdneri*. *Comp. Biochem. Physiol.* 66C: 77-82.
- Widdows, J. 1978. Physiological indices of stress in *Mytilus edulis*. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.* 58: 125-142.
- Widdows, J., T. Bakke, B.L. Bayne, P. Donkin, D.R. Livingstone, D.M. Lowe, M.N. Moore, S.V. Evans and S.L. Moore. 1982. Responses of *Mytilus edulis* on exposure to the water accommodated fraction of North Sea Oil. *Mar. Biol.* 67: 15-31.
- Widdows, J. and D. Jhonson. 1988. Physiological energetics of *Mytilus edulis*: scope for growth. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 46: 113-121.
- Widdows, J., K.A. Burns, N.R. Menon, D.S. Page and S. Soria. 1990. Measurement of physiological energetics (scope for growth) and chemical contaminants in mussels (*Arca zebra*) transplanted along a contamination gradient in Bermuda. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 138: 99-117.
- Williams, A.B. 1984. *Shrimps, Lobsters and Crabs of the Atlantic Coast of the Eastern United States, Marine to Florida*. Smithsonian Institution Press. USA. 550 pp.
- Winberg, G.G. 1960. Rate of metabolism and food requirement of fishes. *Fish. Res. Board. Can. Transl. Serv.* 194: 202-211.
- Whitfield M., D.R. Turner and A.G. Dickson. 1981. Speciation of dissolved constituents in estuaries. p. 16-19. In: *River Inputs to Ocean Systems*. Proceedings of UNESCO/IOC/UNEP Review Workshop, March 1979. N.Y.
- Wong, C.K. 1992. Effects of chromium, copper, nickel and zinc on survival and feeding of the cladoceran *Moina macropora*. *Bull. Environm. Contam. Toxicol.* 45: 593-599.
- Wright, D.A. 1980. Calcium balance in premoult and post-moult *Gammarus pulex* (Amphipoda). *Freshwat. Biol.* 67: 163-173.

- Yañez-Arancibia, A. 1986. *Ecología de la Zona Costera. Análisis de Siete Tópicos*. A.G.T. S.A. México, D.F. 189 pp.
- Yañez-Arancibia, A. and J.W. Day, Jr. 1988. Ecological characterization of Terminos Lagoon, a tropical lagoon-estuarine system in the southern Gulf of Mexico. Chap. 1: 1-26 pp. In: Yañez-Arancibia, A. and J.W. Day, Jr. (Eds.). *Ecology of Coastal Ecosystems in the Southern Gulf of Mexico: The Terminos Lagoon Region*. Inst. Cienc. del Mar y Limnol. UNAM. Coatt. Ecol. Inst. LSU. Editorial Universitaria, México, D.F.
- Yañez-Arancibia, A., A.L. Lara-Domínguez, P. Chavance y D. Flórez-Hernández. 1988. Comportamiento ambiental de la Laguna de Terminos. Cap. 2: 27-40 pp. In: Yañez-Arancibia, A. and J.W. Day, Jr. (Eds.). *Ecology of Coastal Ecosystems in the Southern Gulf of Mexico: The Terminos Lagoon Region*. Inst. Cienc. del Mar y Limnol. UNAM. Coast. Ecol. Inst. LSU. Editorial Universitaria, México, D.F.
- Zanders, P. and W. Rojas. 1992. Cadmium accumulation, LC50 and oxygen consumption in the tropical marine amphipod *Elasmopus rapax*. *Mar. Biol.* 113: 409-413.
- Zar, J. 1984. *Biostatistical Analysis*. Prentice Hall, Inc. New Jersey. 718 pp.
- Zúñiga, O., R. Wilson and E. Oyarce. 1984. Tasa de excreción de amonio del camarón roca *Rhynchocinetes typus* en condiciones de laboratorio (Crustacea: Decapoda: Rhynchocinetidae). *Rev. Biol. Mar. Valparaíso*. 20 (2): 113-126.

ANEXOS

Tabla A1a. Mortalidad acumulada (%) de los juveniles de *P. setiferus* expuestos durante 96 h a diferentes concentraciones de cadmio (mg/L). n = número de organismos; s = número de sobrevivientes.

Tiempo h	Cd , mg/L						
	0	0.43	0.76	2.58	4.46	4.80	5.80
4	0	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	6	6	0	5
16	0	0	6	22	17	22	30
24	0	6	11	44	56	72	95
36	0	6	17	61	83	83	95
48	0	11	28	67	94	94	100
60	0	28	39	72	94	94	100
72	0	28	39	72	94	94	100
84	0	28	39	72	94	100	100
96	0	28	39	72	94	100	100
n	16	18	18	18	18	18	20
s	16	13	9	5	1	0	0

Tabla A1b. Mortalidad acumulada (%) de los juveniles de *P. setiferus* expuestos durante 96 h a diferentes concentraciones de zinc (mg /L). n = número de organismos; s = número de sobrevivientes.

Tiempo h	Zn , mg/L						
	0	1.40	8.50	11.60	28.40	62.50	105.1
4	0	0	0	0	0	13	0
8	0	0	0	0	0	13	0
16	0	0	0	6	7	13	13
24	0	0	19	13	7	13	38
36	0	0	19	13	7	33	63
48	0	0	19	13	13	33	75
60	0	0	19	13	27	53	75
72	0	0	19	19	27	53	75
84	0	7	19	19	27	53	100
96	0	7	19	31	47	53	100
n	16	15	16	16	15	15	16
s	16	14	13	11	8	7	0

Tabla A1c. Mortalidad acumulada (%) de los juveniles de *P. setiferus* expuestos durante 96 h a diferentes unidades de toxicidad (UT) de la mezcla de cadmio y zinc, correspondientes a una razón de toxicidad (RT) 1:1. n = número de organismos; s = número de sobrevivientes.

Tiempo h	UT					
	0	0.10	0.15	0.28	0.38	0.55
4	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0
16	0	0	0	7	0	6
24	0	5	5	7	38	19
36	0	5	10	27	38	25
48	0	5	10	27	38	31
60	0	5	15	27	44	44
72	0	5	20	33	56	56
84	0	5	25	40	56	63
96	0	5	25	47	56	75
n	16	20	20	15	16	16
s	16	19	15	8	7	4

Tabla A1d. Mortalidad acumulada (%) de los juveniles de *P. setiferus* expuestos durante 96 h a diferentes unidades de toxicidad (UT) de la mezcla de cadmio y zinc, correspondientes a una razón de toxicidad (RT) 2.3:1. n = número de organismos; s = número de sobrevivientes.

Tiempo h	UT					
	0	0.07	0.20	0.26	0.41	0.59
4	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	6	19	19
16	0	0	0	19	19	25
24	0	0	5	25	25	31
36	0	5	5	31	31	44
48	0	5	10	44	31	56
60	0	5	15	44	50	63
72	0	10	15	50	63	69
84	0	10	15	50	69	75
96	0	10	15	56	81	81
n	16	20	20	16	16	16
s	16	18	17	7	3	3

Tabla A2a. Parámetros y estimadores de las regresiones lineales que relacionan el peso seco (PS, g) y húmedo (PH, g), de los juveniles de *P. setiferus* expuestos durante 21 días a diferentes concentraciones de cadmio (mg/L) y zinc (mg/L). $PS = a + b PH$; R^2 = coeficiente de determinación.

Cd , mg/L	a	b	R ²	Zn , mg/L	a	b	R ²
0	0.161	0.171	0.96	0	0.161	0.171	0.96
0.05	-0.019	0.229	0.95	0.16	0.039	0.219	0.99
0.14	-0.052	0.248	1.00	0.26	-0.025	0.228	1.00

Tabla A2b. Parámetros y estimadores de las regresiones lineales que relacionan el peso seco (PS, g) y húmedo (PH, g), de los juveniles de *P. setiferus* expuestos durante 15 días en diferentes unidades de toxicidad (UT) de las mezclas de cadmio y zinc correspondientes a dos razones de toxicidad (RT): 1:1 y 2.3:1. $PS = a + b PH$; R^2 = coeficiente de determinación.

UT	RT 1:1		R ²	UT	RT 2.3:1		R ²
	a	b			a	b	
0	0.161	0.171	0.96	0	0.161	0.171	0.96
0.025	-0.019	0.229	0.95	0.020	0.039	0.219	0.99
0.040	-0.052	0.248	1.00	0.035	-0.025	0.228	1.00

Tabla A3. Análisis Químico Proximal del alimento balanceado Camaronina (35% proteína; Raslrom Purina Co.) suministrado a los juveniles de *P. setiferus*.

Composición	Base Húmeda %	Base 90 Mat.seca,%	Base Seca %
Materia seca, %	90.90	90.00	100.00
Humedad, %	9.10	10.00	0.00
Prot. cruda (N x 6.25), %	37.02	36.66	40.73
Extracto etéreo, %	10.83	10.72	11.91
Cenizas, %	8.09	8.01	8.89
Fibra cruda, %	3.39	3.36	3.73
Ext. libre de N, %	31.57	31.26	34.73
Total N digerible, %	79.80	79.01	87.79
Energía digerible, kcal kg ⁻¹	3 518.42	3 483.71	3 870.79
Energía metabolizable, kcal kg ⁻¹	2 884.80	2 856.34	3 173.72.
Energía bruta, kcal kg ⁻¹	----	-----	5 448.08

Análisis efectuado en el Departamento de Nutrición Animal y Bioquímica (SARH No.0980693), Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM.