



00344 6
24

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

ALTERACIONES FISIOLÓGICAS EN POSTLARVAS
DE *Penaeus vannamei* (CRUSTACEA: DECAPODA)
POR EFECTO DEL AMONIO.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRO EN CIENCIAS
(BIOLOGIA DE SISTEMAS Y RECURSOS ACUÁTICOS)

P R E S E N T A :

HUGO RODOLFO MOLINA ARROYO

DIRECTOR DE TESIS: DRA. GUILLERMINA ALCARAZ ZUBELDIA.
CO-DIRECTOR: DRA. RUTH CECILIA VANEGAS PEREZ.

MEXICO, D F.

1988

TESIS CON
FALLA DE CRECIMIENTO

270202 7



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Este trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Ecofisiología de la Facultad de Ciencias de la UNAM con el apoyo de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (proyecto PAPIIT, IN 204295) bajo la dirección de la Dra. Guillermina Alacará Zubeldía y de la Dra. Ruth Cecilia Vanegas Pérez.

A mis padres Marcial y Bertha

A mis hermanos Luis, Araceli, Marco y Jesús

A mis sobrinos Jorge, Ise, Arantza y Aseret

A mis cuñados Susana, Teresa y Antonio

Por todo lo que significan

Sugo Molina

1999

Mi agradecimiento a la Dra. Guillermina Alcaraz Zubeldia y a la Dra. Cecilia Vanegas Pérez por su dirección e interés en mi superación. Por su amistad.

A los miembros del jurado Dr. Xavier Chiappa Carrara, Dr. René de Jesús Cárdenas Vázquez, Dr. Carlos Rosas Vazquez, Dr. Fernando Alvarez Noguera y Dra. Elva Escobar Briones por su colaboración, asesoría y revisión crítica a este trabajo.

A la Dra. Sonia Espina, Dra. Gabriela Gaxiola y M. en C. Adolfo Sánchez, por compartir sus conocimientos y permitirme aprender a su lado.

A mis compañeros de Laboratorio Caty, Vero, Luz, Cecy, Fabian, Alicia, Cris y Gaby por sus comentarios y colaboración en el desarrollo del presente trabajo. Por su amistad.

A la "chilanga y poblana banda" por su entrañable amistad y los momentos gratos que hemos compartido.

A la Sra. María Bernal y familia Cruz Bernal por su apoyo incondicional.
¡Gracias!

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) por la beca otorgada para la realización de mis estudios de maestría.

GRACIAS

INDICE

RESUMEN.....	1
I. INTRODUCCION.....	2
HIPOTESIS.....	8
OBJETIVOS.....	8
II. MATERIALES Y METODOS.....	10
1. Mantenimiento.....	10
2. Fase experimental.....	11
a) acumulación.....	14
b) Excreción nitrogenada.....	14
c) Consumo de oxígeno.....	17
d) Crecimiento.....	18
e) Contenido de agua.....	19
3. Análisis estadístico.....	20
III. RESULTADOS.....	21
a) acumulación.....	21
b) Excreción nitrogenada.....	26
c) Consumo de oxígeno.....	28
d) Crecimiento.....	30
e) Contenido de agua.....	33
IV. DISCUSION.....	34
V. CONCLUSIONES.....	46
VI. LITERATURA CITADA.....	48
VII. ANEXO.....	55

RESUMEN

En ambientes de cultivo, la acumulación del amonio puede afectar la integridad biológica de los camarones peneidos alterando su crecimiento y sobrevivencia. En este trabajo se determinó el efecto subletal del amonio en las postlarvas (PL 26 y 38) de *Penaeus vannamei* especie de reconocida importancia en la acuicultura. Se efectuaron bioensayos crónicos semiestáticos con recambio en los cuales los camarones se expusieron a niveles de 0.2, 0.4 y 0.6 mg N-NH₃ L⁻¹ correspondientes a 2.41, 4.54 y 7.72 mg N-amonio L⁻¹. Se considero un grupo testigo sin adición de amonio. El efecto tóxico del amonio se evaluó a través de la estimación de la acumulación corporal de amonio, el consumo de oxígeno y la excreción de amonio de las postlarvas expuestas 4h, 24h y 12 d al amonio. El efecto sobre el crecimiento y el balance de agua se evaluó al terminó de la exposición crónica.

Durante el periodo experimental no se observó mortalidad en los organismos. La exposición inicial (4h) no alteró el contenido corporal de amonio; al aumentar el tiempo de exposición la acumulación corporal de amonio es significativa a partir de 0.4 mg N-NH₃ L⁻¹ a las 24 h de exposición y de 0.6 mg N-NH₃ L⁻¹ a los 12 días de exposición. Los valores negativos obtenidos en la tasa de excreción de amonio de los camarones desde niveles externos de 0.2 mg N-NH₃ L⁻¹ y a partir de 4 h de exposición al amonio sugiere la entrada del amonio al medio interno de los organismos. Los resultados obtenidos permiten suponer que las postlarvas presentan mecanismos encargados de regular y desintoxicar el amonio corporal de manera efectiva durante las primeras horas de exposición; sin embargo, la eficiencia para mantener los niveles de amonio corporal disminuye al aumentar el tiempo de exposición sobre todo en concentraciones superiores a 0.4 mg N-NH₃ L⁻¹.

El incremento observado en el consumo de oxígeno (> 60 %) de las postlarvas de *P. vannamei* durante las primeras horas de exposición, puede atribuirse al costo energético dirigido a la regulación interna y desintoxicación del amonio, mientras que la disminución en el consumo de oxígeno (> 30 %) observada a los 12 d de exposición puede ser reflejo de la incapacidad de los organismos para responder a las demandas del incremento de ATP y a la disminución en la actividad general de los organismos.

El efecto tóxico crónico del amonio se reflejó en la tasa de crecimiento de las postlarvas. La concentración a la cual el crecimiento se reduce en un 50 % (CE₅₀) se estimó en 0.70 mg N-NH₃ L⁻¹ (6.52 mg N-amonio L⁻¹); la concentración máxima aceptable de amonio ambiental en la cual el crecimiento de las postlarvas disminuye un 5 % (CE₅) se calculó en 0.35 mg N-NH₃ L⁻¹ (3.26 mg N-amonio L⁻¹).

Los resultados obtenidos indican que en exposiciones crónicas, concentraciones de amonio consideradas subletales, deterioran la integridad biológica de las postlarvas de *P. vannamei*. Sin embargo, la tolerancia al incremento del amonio externo en las postlarvas de *P. vannamei* es mayor que en otras especies de peneidos.

I. INTRODUCCION

A pesar de la ganancia económica que representa la captura del camarón para la industria pesquera mundial (2,893,000 toneladas en 1993; SEMARNAP, 1996), se ha generado la escasez de poblaciones naturales del producto como consecuencia de la pérdida de áreas de crianza, la sobre explotación de las poblaciones naturales y las repetidas vedas mal instrumentadas (Smith, 1988). En este contexto, el incremento en la demanda y suministro de grandes cantidades de camarón con un alto valor comercial a un mercado mundial en crecimiento, ha estimulado el desarrollo de la camaronicultura la cual se ha planteado como una alternativa complementaria a la explotación de las poblaciones naturales.

Entre los principales productores mundiales de camarón cultivado se encuentran Thailandia, Indonesia, Filipinas, China y Ecuador (SEMARNAP, 1996). En América Latina, el cultivo de camarones del genero *Penaeus* ha adquirido especial importancia ya que a excepción de Asia, esta región es la que presenta el mayor potencial para el desarrollo de la camaronicultura en el mundo, debido a la extensión y a las características de la zona costera.

En la última década, México se ha mantenido dentro de los primeros 10 productores mundiales de camarón cultivado, con una producción de 13,315 toneladas/año, lo que representa a nivel nacional el 17 % de la producción total del crustáceo (SEMARNAP, 1996). En México, el cultivo de camarón es una actividad muy reciente y ha recibido un gran impulso por parte de las instituciones gubernamentales. Se calcula que el país cuenta con 200 granjas de engorda, 18 laboratorios para producir larvas y unas 5,000 hectáreas de cultivo, todo ello sustentado principalmente en las especies

nativas del pacífico mexicano *Penaeus vannamei* y *Penaeus stylirostris* (World Shrimp Farming, 1994).

El camarón blanco del Pacífico, *P. vannamei*, no sólo destaca en la producción de la captura natural, sino también en la producción acuícola. *P. vannamei* es una especie nativa de la costa oeste del Océano Pacífico, con una distribución amplia desde la parte norte del Golfo de California hasta las costas de Perú. Se puede encontrar en aguas costeras hasta 72 m de profundidad, siendo más abundante sobre fondos fangosos. Los adultos habitan ambientes marinos mientras que los estadios de postlarva a juvenil habitan ambientes estuarinos (Martínez, 1993).

En sistemas de cultivo, *P. vannamei* se desarrolla adecuadamente en intervalos de temperatura y salinidad amplios. Se ha reportado, que esta especie puede alcanzar en periodos de 4 a 6 meses tallas de hasta 20 gramos a partir de postlarvas de 5 a 15 días de edad con una sobrevivencia del 70 % (Lawrence *et al.*, 1983). En general, esta especie es muy apreciada por los acuicultores por su resistencia, por su elevada tasa de crecimiento, talla y valor comercial.

En las granjas camaroneras son frecuentes los cambios diarios o temporales en la calidad del agua. Algunos de sus constituyentes químicos pueden incrementar su concentración hasta llegar a constituirse en elementos tóxicos. Tal es el caso del amonio, compuesto que es considerado el más común de los contaminantes en los sistemas de cultivo (Chen y Lin, 1992a). En condiciones de cultivo intensivo, el amonio puede incrementarse después de 101 y 115 días hasta niveles de 7.78 y 46.11 mg N-amonio L⁻¹ (0.15 y 0.86 mg N-NH₃ L⁻¹) (Chen y Lai, 1992)

En el medio acuático, el amonio se encuentra presente en equilibrio como una mezcla de dos formas químicas: una ionizada (NH_4^+) y otra no ionizada (NH_3). La proporción en la que se encuentran ambas formas químicas depende de varios factores, entre los que destacan el pH, la temperatura y la salinidad (Bower y Bidwel, 1978). En condiciones naturales, el amonio es oxidado a nitrito por bacterias aerobias autotróficas, del género *Nitrosomonas*. Sin embargo, en ambientes de cultivo en los cuales la tasa de recambio de agua es inadecuada, la temperatura es elevada y la concentración de oxígeno es baja, este proceso puede verse alterado, con la consecuente acumulación del amonio en el medio (Anthoniesen *et al.*, 1976).

El amonio presente en los sistemas de cultivo, es principalmente resultado de la excreción de compuestos nitrogenados de los organismos mantenidos en altas densidades, y al exceso de materia orgánica como el alimento remanente no consumido y de los organismos muertos (Spote, 1979; Regnault, 1987). Asu vez, otra vía de entrada de amonio al sistema es a partir de los fertilizantes empleados en los estanques de cultivo.

Los crustáceos acuáticos son considerados amoniotélicos, debido a que entre el 50 y el 90 % de los productos metabólicos nitrogenados se excretan en forma de amonio (Regnault, 1987). En este sentido, la difusión del NH_3 de la hemolinfa al agua, el intercambio de NH_4^+ por Na^+ y la conversión de amonio a urea y su excreción, son rutas por las cuales los crustáceos eliminan el amonio (Campbell, 1973); de éstas, la difusión de NH_3 es la principal debido a que los niveles de amonio en la hemolinfa son normalmente más altos que los del medio, lo cual facilita el proceso de difusión (Kormanik y Cameron, 1981).

En condiciones normales, la concentración de amonio en la hemolinfa de crustáceos (mg L^{-1} , $\text{NH}_4^+ + \text{NH}_3$) se ha reportado de 2 a 18 mg L^{-1} de amonio total, la cual puede verse incrementada dependiendo de los niveles de amonio en el medio externo. Este incremento en la concentración interna de amonio se ha reportado en adultos de *P. japonicus* después de 2 horas de exposición en concentraciones superiores a $0.69 \text{ mg N-NH}_3 \text{ L}^{-1}$ (Chen y Kou, 1991).

De manera general se considera que la forma química no ionizada del amonio (NH_3) es más tóxica para los organismos acuáticos debido a su tamaño menor y a su naturaleza lipofílica, lo cual facilita su difusión pasiva a través de las membranas celulares, a diferencia de la forma ionizada (NH_4^+), cuyo transporte a través de las membranas celulares es menor debido a su tamaño mayor y a su naturaleza lipofóbica (Kormanik y Cameron, 1981). Sin embargo, de acuerdo a Cameron (1986) la proporción del NH_4^+ que puede difundir a través de la membrana branquial, depende de la abundancia relativa del NH_3 y NH_4^+ en el medio y de la permeabilidad relativa a ambas especies químicas, donde la difusión del NH_4^+ puede variar del 3 % a más del 90 %. Al respecto, Chen y Kou (1991) mencionan que la elevación de la concentración de amonio en la hemolinfa de *Penaeus japonicus* expuestos al amonio puede atribuirse tanto a la difusión del NH_3 como del NH_4^+ así como a la penetración de NH_4^+ ambiental por intercambio con el Na^+ del medio interno de los organismos.

La toxicidad del amonio en los organismos acuáticos depende de su concentración en el medio y del tiempo de exposición al mismo; así mismo, depende de la sensibilidad de la especie, del estado de desarrollo y de las condiciones fisicoquímicas del medio, principalmente del pH, la temperatura, el oxígeno disuelto y la salinidad (Regnault, 1987). En los sistemas de cultivo, la acumulación del amonio causa estrés en los organismos, lo cual puede desencadenar alteraciones en su estado fisiológico o conducirlos a la muerte.

En los camarones peneidos, la toxicidad del amonio se ha estudiado frecuentemente a través de exposiciones agudas. La información generada es numerosa y se ha analizado el efecto tóxico letal en diversos estadios de desarrollo de diferentes especies. Los estudios de toxicidad aguda al amonio en *P. vannamei* (Piña, 1998) demuestran que las postlarvas y juveniles de esta especie son más tolerantes al efecto tóxico del amonio que las postlarvas de *P. monodon* (Chin y Chen, 1987), *P. japonicus* (Lin *et al.*, 1993), *P. chinensis* (Chen y Lin, 1991a), *P. Paulensis* (Ostrensky y Wasidelesky, 1995) y *P. Setiferus* (Espinoza, 1998). Sin embargo, la información generada sobre el efecto adverso de exposiciones crónicas al amonio es de mayor importancia ya que permite cuantificar el estrés producido por concentraciones subletales del tóxico. En tales condiciones, cualquier alteración a nivel conductual, bioquímico y fisiológico puede repercutir adversamente en el crecimiento y la sobrevivencia de los organismos y consecuentemente en su producción (Tomasso, 1996).

En camarones peneidos, la exposición al amonio puede alterar la osmorregulación de los organismos (Lin *et al.*, 1993). En los juveniles de *P. chinensis* se ha demostrado la modificación de los procesos de osmorregulación y excreción nitrogenada relacionados con la alteración de la actividad enzimática de la $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPasa branquial por efecto de concentraciones externas mayores a $0.43 \text{ mg N-NH}_3 \text{ L}^{-1}$ (Chen y Nan, 1992). Así mismo, Chen y Chen (1996) reportan la alteración en la osmoregulación de *P. japonicus* expuestos en concentraciones de $1.14 \text{ mg N-NH}_3 \text{ L}^{-1}$, ocasionando la disminución de los niveles de sodio, potasio, magnesio y cloro en hemolinfa, alteraciones relacionadas con la incorporación y acumulación del tóxico en el medio interno de los organismos.

El incremento de los niveles de amonio en el medio externo modifica a su vez el metabolismo aerobio de los peneidos. Al respecto Chen y Lin (1992b) reportan el incremento en el consumo de oxígeno de los juveniles de *P. chinensis* despues de ser expuestos durante 4 h en concentraciones superiores a 0.19 mg N-NH₃ L⁻¹. Así mismo, Chen y Lai (1992), señalan el aumento en la tasa respiratoria de los juveniles de *P. japonicus* despues de la segunda hora de exposición y a partir de niveles de 0.34 mg N-NH₃ L⁻¹. Tal incremento en la tasa respiratoria también ha sido documentado en juveniles de *Penaeus chinensis*, con cambios significativos despues de 20 h de exposición a 0.68 mg N-amonio L⁻¹. (Chen *et al.*, 1991). Las modificaciones señaladas en la tasa respiratoria de los peneidos se relacionaron con los cambios tanto en la excreción nitrogenada, como en la acumulación del tóxico en la hemolinfa de los camarones.

En exposiciones crónicas, el amonio altera el crecimiento de los peneidos. En las postlarvas de *Penaeus monodon* la exposición durante 16 días a 3 y 6 mg N-NH₄⁺ L⁻¹ provoca una reducción en el crecimiento del 4 y 6 %, respectivamente (Noor-Hamid *et al.*, 1994). En los juveniles de *P. penicillatus* expuestos por 10 días en 0.76 mg N-NH₃ L⁻¹ se observa una disminución del 41 % en la ganancia de peso respecto al grupo testigo (Chen y Lin, 1991b); así mismo, la ganancia relativa de peso disminuye significativamente conforme se incrementa el tiempo de exposición al tóxico (Chen y Lin, 1992a). La exposición crónica en concentraciones subletales de amonio modifica de manera directa el crecimiento y la frecuencia de muda de las larvas de *Metapenaeus ensis* (Chen y Nan, 1991) y de los juveniles de *P. japonicus* (Chen y Kou, 1992). A su vez, la exposición crónica (10 días) a 0.4 y 0.7 mg N-NH₃ L⁻¹ reduce significativamente el crecimiento de las postlarvas de *P. setiferus* (Robles, 1997).

La posibilidad de establecer y predecir el impacto de algunos contaminantes como el amonio es de gran importancia para determinar la máxima concentración que se puede acumular en el medio sin que esto afecte de manera significativa el cultivo, más aún si se considera que el efecto adverso del amonio incide principalmente en los estados más sensibles de los organismos como los estadios larvales y postlarvales (Chen y Lin, 1991a).

HIPOTESIS

La acumulación del amonio en los sistemas de cultivo aun en concentraciones subletales, ejerce efecto tóxico en los camarones alterando diferentes respuestas fisiológicas como el consumo de oxígeno, la excreción nitrogenada y el crecimiento.

Ante la presencia del amonio en el medio, los organismos tienen la capacidad de responder y/o compensar ante la acción tóxica del amonio, dependiendo del tiempo y la intensidad de la exposición. Tales procesos demandan energía lo cual se puede manifestar en cambios en la tasa respiratoria y reducción en el crecimiento.

OBJETIVOS

Debido a la importancia del camarón blanco *Penaeus vannamei* en la producción camaronera nacional y considerando el efecto tóxico del amonio en la acuicultura, el propósito de este trabajo fue evaluar el efecto de la exposición crónica subletal al amonio, en postlarvas de *Penaeus vannamei*.

Objetivos particulares.

1. Determinar la acumulación del amonio en las postlarvas de *Penaeus vannamei* expuestas a diferentes concentraciones subletales del tóxico.
2. Estimar el efecto de las concentraciones subletales del amonio sobre la excreción nitrogenada y el consumo de oxígeno de los organismos.
3. Evaluar las modificaciones en el contenido de agua de las postlarvas en función del tiempo de exposición a las diferentes condiciones experimentales.
4. Estimar las modificaciones en el crecimiento de las postlarvas de *P. vannamei* por la exposición crónica al amonio.
5. Determinar los niveles críticos de amonio para el crecimiento de las postlarvas de *P. vannamei*.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

Las postlarvas del camarón blanco *Penaeus vannamei* utilizadas en el presente estudio se obtuvieron del Laboratorio de Producción Comercial Nauplio S.A. ubicado en la Paz, B.C.S., a partir de hembras reproductoras inseminadas manualmente y desovadas en condiciones de laboratorio. Las postlarvas de *P. vannamei* de 16 días de edad (PL₁₆) fueron transportadas al laboratorio de Ecofisiología de la Facultad de Ciencias de la UNAM en bolsas de polietileno con agua del medio de cultivo a 34 ‰ de salinidad, atmósfera saturada de oxígeno y temperatura ambiente.

I. Mantenimiento

Una vez en el laboratorio, las postlarvas se dividieron en dos grupos de 750 organismos y se colocaron en acuarios de 70 L de capacidad cada uno equipados con filtros mecánicos externos y con agua a la temperatura y salinidad utilizadas durante el transporte. Estos parámetros fueron gradualmente ajustados por medio de recambios diarios del 20 % del volumen de agua (2 ‰ día⁻¹ y 2° C día⁻¹) hasta alcanzar 25 ‰ de salinidad y 28° C de temperatura, parámetros que se mantuvieron constantes durante el periodo de mantenimiento. El fotoperíodo se fijó en 12:12 h luz:oscuridad. El oxígeno disuelto (> 5 mg O₂ L⁻¹) y el pH (8.3 ± 0.1) permanecieron constantes durante todo el estudio.

Posteriormente, las postlarvas se colocaron en acuarios de 250 L de capacidad acondicionados con filtros biológicos en los cuales permanecieron durante cinco días, manteniendo constantes los factores fisicoquímicos señalados. Durante el periodo de mantenimiento, los camarones fueron alimentados a las 8:00, 12:00 y 16:00 hrs con alimento balanceado peletizado

y particulado (50 % proteína) al 120 % de su peso húmedo corporal. Durante la noche (20:00 h) se les suministraron 40 nauplios de *Artemia franciscana* por postlarva como complemento alimenticio (Gaxiola, 1994).

Durante todo el estudio se utilizó agua de mar artificial (Instant Ocean). Diariamente se tomaron registros de los parámetros fisicoquímicos del agua: el oxígeno disuelto se midió con un oxímetro con sensor polarográfico YSI-54 ARC ($\pm 0.05 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$), la temperatura con un termómetro de mercurio Branman ($\pm 1^\circ \text{C}$), la salinidad con un refractómetro (ATAGO; $\pm 0.5 \text{ ‰}$) y el pH con un potenciómetro Whatman (TRANS INSTRUMENT; ± 0.05 unidades).

2. Fase experimental

En el presente estudio se emplean los siguientes términos, relativos a las concentraciones de amonio utilizadas (mg L^{-1}).

amonio total como nitrógeno: N-amonio

amonio no ionizado como nitrógeno: N-NH₃

amonio ionizado como nitrógeno: N-NH₄⁺

Para evaluar el efecto crónico del amonio en las postlarvas de *P. vannamei* se seleccionaron tres concentraciones subletales de 0.2, 0.4 y 0.6 mg N-NH₃ L⁻¹. Las respectivas proporciones de nitrógeno de amonio ionizado ($\text{mg N-NH}_4^+ \text{ L}^{-1}$) y nitrógeno de amonio total ($\text{mg N-amonio L}^{-1}$) se señalan en la siguiente tabla; los niveles de N-NH₃ y N-NH₄⁺ se estimaron considerando una temperatura, salinidad y pH del agua de 28 °C, 25 ‰, y 8.3 unidades respectivamente (Bower y Bidwell, 1978).

Concentraciones de amonio (mg L^{-1}) empleadas para evaluar el efecto crónico subletal del amonio en postlarvas de *P. vannamei*.

N-NH ₃ (mg L^{-1})	N-NH ₄ ⁺ (mg L^{-1})	N-amonio (mg L^{-1})
Testigo	0	0
0.2	2.21	2.41
0.4	4.14	4.54
0.6	7.62	7.72

Las concentraciones seleccionadas se eligieron a partir de experimentos previos sobre la toxicidad aguda del amonio en postlarvas de *P. vannamei*, las cuales produjeron una mortalidad menor al 1 % en pruebas de 96 h (Piña *et al.*, 1997). Las concentraciones experimentales del tóxico se obtuvieron a partir de una solución concentrada de cloruro de amonio (NH₄ Cl, BAKER; 99.7 % de pureza).

El efecto crónico del amonio sobre las postlarvas de *P. vannamei*, se evaluó mediante bioensayos semiestáticos con recambio (UNEP, 1987). Se emplearon postlarvas de 26 días de edad (PL₂₆; 16.91 ± 1.07 mg PH) las cuales permanecieron 24 h sin alimentación en los acuarios de mantenimiento previo a la exposición al tóxico. Posteriormente, para cada condición experimental se colocaron al azar 150 organismos en acuarios de vidrio de 40 L de capacidad equipados con calentadores y aireación constante. Se consideró un grupo testigo sin adición del amonio. Todos los ensayos se efectuaron por duplicado.

Durante el periodo experimental se efectuaron recambios diarios del 20 % del volumen de agua de los acuarios y se renovaron las respectivas soluciones del tóxico. Diariamente se tomaron muestras de agua antes y después del recambio para conocer la concentración real del contaminante en las diferentes condiciones experimentales. Durante el recambio se retiraron las exuvias, el alimento remanente y las heces producidas por las postlarvas. A lo largo del período experimental se monitorearon y se mantuvieron constantes la temperatura en $28 \pm 1^\circ\text{C}$, el oxígeno disuelto en $5 \pm 1 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$ la salinidad en $25 \pm 1\%$, y el pH en 8.3 ± 0.1 unidades. Los organismos se alimentaron considerando la dieta y el horario señalados previamente.

Las concentraciones de amonio total (mg L^{-1}) en los acuarios experimentales se cuantificaron mediante la técnica de azul de indofenol (Rodier, 1981). La concentración de amonio no ionizado (mg L^{-1}) en cada acuario experimental se calculó a partir de las ecuaciones reportadas por Bower y Bidwell (1978), tomando en consideración la salinidad, la temperatura y el pH del agua.

Los efectos subletales causados por el amonio en las postlarvas de *P.vannamei* se estimaron a través de la acumulación corporal del amonio, de la modificación en la excreción nitrogenada y el consumo de oxígeno (metabolismo de rutina). Estas respuestas se evaluaron después de 4 h, 24 h y 12 días de exposición. Al concluir este periodo (12 días) se determinó el contenido corporal de agua y el crecimiento. Así mismo, se calculó la concentración efectiva del amonio a la cual el crecimiento de los organismos se reduce al 5 % (CE_5) y 50 % (CE_{50}) con respecto al grupo testigo. Cabe señalar que previo a todas las mediciones, los organismos permanecieron 24 horas en ayuno.

a.- Acumulación

La acumulación corporal de amonio en las postlarvas de *P. vannamei* expuestas a las diferentes condiciones experimentales se midió después de 4 y 24 h de exposición (PL₂₆, PL₂₇) y una vez concluido el periodo de exposición de 12 días (PL₃₈). Para cada condición experimental y para cada tiempo de exposición, se utilizaron 16 organismos muestreados aleatoriamente de los acuarios experimentales.

Para estas determinaciones se utilizaron organismos completos; se enjuagaron con agua desionizada, se secaron con papel absorbente y se pesaron (PH, mg). Inmediatamente después se homogenizaron en 3 ml de una solución amortiguadora de fosfato de sodio 10 mM (NaH₂HPO₄ y NaHPO₄, pH 7.0). Posteriormente el homogenado se centrifugó a 2890 rpm durante diez minutos (DYNAMIC[®] Centrifuge Mod. 420101). De inmediato se colectó 1 ml del sobrenadante y se analizó la concentración del amonio total a través de la técnica de azul de indofenol (Rodier, 1981). Todo el procedimiento se efectuó en frío (sobre hielo). La concentración de amonio se relacionó con el peso húmedo corporal de los organismos y se expresó en mg N-amonio L⁻¹ mg⁻¹ PH.

b.- Excreción nitrogenada

Con el fin de conocer el efecto del amonio sobre la excreción nitrogenada de las postlarvas de *P. vannamei*, se midió la tasa de excreción de amonio de los organismos expuestos a las diferentes concentraciones del tóxico. Cabe señalar que los crustáceos acuáticos son amoniotélicos, representando la excreción de amonio más del 60 % del total de los productos nitrogenados excretados (Regnault, 1996).

La excreción nitrogenada de los camarones se midió en un sistema termostregulado de flujo semicontínuo, conectado a un sistema de control y suministro regulado de las soluciones experimentales que permitió en cada caso mantener constantes las concentraciones del tóxico.

Para cada grupo experimental se utilizó un sistema, y se evaluó en cada tiempo de exposición la excreción de amonio de los organismos. El volumen de cámaras utilizadas para las postlarvas expuestas durante 4 y 24 h al amonio (PL_{26-27}) fue de 16 mL y para las expuestas por 12 días (PL_{38}) fue de 50 mL (Fig. 1).

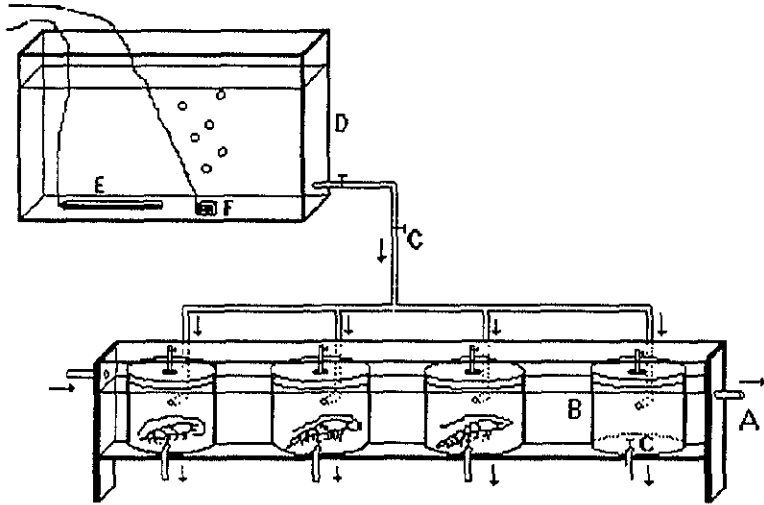


Fig. 1. Sistema de flujo semicontínuo. A- Baño termostregulado, B-Cámara, C- Llaves de control de flujo de agua, D- Reservorio, E-Termostato, F- Aireador.

Para evaluar el efecto del amonio sobre la excreción de amonio de las postlarvas a las 4 y 24 horas de exposición, por cada concentración experimental de amonio se utilizaron 10 postlarvas, las cuales fueron colocadas de manera individual en las cámaras. Las postlarvas permanecieron tres horas en el dispositivo experimental antes de colocar el contaminante a fin de disminuir el estrés producto de la manipulación. Posteriormente, se adicionó la concentración de amonio requerida a los reservorios y se efectuó el recambio de agua en las cámaras experimentales asegurando los niveles correspondientes del tóxico. Dos horas después se iniciaron las mediciones. En este sistema, los organismos permanecieron hasta concluir 24 h de exposición. De igual manera, al término de la exposición (12 días) se evaluó la excreción de amonio de los camarones de cada condición experimental de manera similar a la descrita previamente.

Para la determinación de la excreción de amonio de los organismos, se tomó una muestra inicial de agua de cada cámara y se suspendió el flujo de agua durante 45 min; posteriormente se tomó una muestra final de agua y se restableció el flujo. La concentración de amonio de las muestras de agua, inicial y final ($\text{mg N-amonio L}^{-1}$), se midió utilizando la técnica azul de indofenol (Rodier, 1988).

La cantidad de amonio excretado por los organismos se calculó por la diferencia entre la concentración de amonio final e inicial (mg L^{-1}) de las muestras de agua de cada cámara, considerando su volumen (V , L), el tiempo (t , h) que éstas permanecieron cerradas (Ecuación 1). Los valores de la excreción de amonio se corrigieron por los valores obtenidos en la cámara

testigo sin organismo. La tasa de excreción de amonio se relacionó con el peso de los organismos (PH, mg), y se expresó en $\mu\text{g N-amonio h}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ PH}$.

$$\text{N-amonio} = \frac{[\text{N-amonio}]_i - [\text{N-amonio}]_f}{t} \cdot V \quad (\text{Ec. 1})$$

c. Consumo de oxígeno

La tasa de consumo de oxígeno se evaluó al mismo tiempo, en los mismos organismos y en el mismo sistema descrito previamente para la cuantificación de la excreción nitrogenada, pero utilizando diferentes muestras de agua.

El consumo de oxígeno de los camarones se calculó por la diferencia entre la concentración de oxígeno disuelto (O_2 , mg L^{-1}) en las muestras de agua tomadas antes (O_2 i) y después (O_2 f) del cerrado de cámaras. Se consideró el volumen de las mismas (V, L) y el tiempo (t, h) en que éstas permanecieron cerradas (Ecuación 2) (Cech, 1995). Los valores se corrigieron por el valor obtenido en la cámara testigo sin organismo y se relacionaron con el peso de los organismos (PH, mg). La tasa metabólica se expresó en $\mu\text{g O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ PH}$:

$$\text{VO}_2 = \frac{[\text{O}_2]_i - [\text{O}_2]_f}{t} \cdot V \quad (\text{Ec. 2})$$

La concentración de oxígeno disuelto se midió con un oxímetro con sensor polarográfico (YS1-54 ARC; $\pm 0.05 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$). Al término de las mediciones los camarones de cada grupo experimental se sacrificaron y se midió su peso húmedo (PH, mg) en una balanza analítica (Sauter, $\pm 0.05 \text{ mg}$).

d.- Crecimiento

La tasa de crecimiento absoluto (C , mg PH d^{-1}) de las postlarvas de *P. vannamei* se estimó a partir del incremento del peso húmedo de los organismos durante los 12 días de exposición crónica al amonio (Ecuación 3) (Busacher *et al.*, 1990):

$$C = [\text{PHf} - \text{Phi}] / t \quad (\text{Ec. 3})$$

El peso húmedo inicial (PHi , mg) se obtuvo de una submuestra de 40 organismos tomados al azar al inicio de las pruebas. El peso húmedo final (PHf , mg) se obtuvo de 55 organismos por cada condición experimental. Las postlarvas fueron pesadas en una balanza analítica (Sauter, ± 0.05 mg). El crecimiento se expresó en mg PH d^{-1} .

Para cada condición experimental se calculó el crecimiento relativo (CR , $\%$) (Ecuación 4) y la ganancia relativa de peso (GR , $\%$) de los organismos (Busacher *et al.*, 1990).

$$\text{CR} = (\text{PHf} - \text{PHi} / \text{PHi}) \cdot 100 \quad (\text{Ec. 4})$$

De igual manera, se estableció la relación entre la concentración externa del amonio no ionizado (mg L^{-1}) y la ganancia relativa de peso (GR , $\%$) de los grupos experimentales con respecto al grupo control. A partir de esta relación, se determinó la concentración de amonio no ionizado (mg L^{-1}) a la cual el crecimiento de los organismos se reduce un 50 % (CE_{50}) y un 5 % (CE_5) respecto al grupo control. La CE_5 se ha reconocido con base en los trabajos de Allan *et al.* (1990) como el nivel máximo aceptable del tóxico para el crecimiento adecuado de los organismos en sistemas de cultivo.

Las CE_{50} y CE_5 se determinaron a partir del modelo cuadrático particular que presentó un mejor ajuste a los datos obtenidos (Ecuación 5).

$$GR = b [\text{mg N-NH}_3 \text{ L}^{-1}]^2 + a \quad (\text{Ec. 5})$$

e.- Contenido de agua

El contenido relativo de agua (%) de las postlarvas de *P. vannamei* expuestas al amonio, se calculó considerando la relación entre el peso húmedo (PH, mg) y el peso seco (PS, mg) de los organismos al final de la exposición al tóxico (Ecuación 6). El peso seco (PS, mg) de los camarones se obtuvo por deshidratación a 60 °C en una estufa (BLUE-M) hasta peso constante.

$$\text{H}_2\text{O, \%} = (\text{PH} - \text{PS}/\text{PH}) \cdot 100 \quad (\text{Ec. 6})$$

3. Análisis Estadístico

La relación entre la acumulación corporal de amonio (A), la concentración externa de amonio no ionizado (E) y el peso húmedo de las postlarvas (P), se establecieron a través del modelo polinomial (Ecuación 7).

$$A = \beta_0 + \beta_1 P + \beta_2 E + \beta_3 P^2 + \beta_4 E^2 + \beta_5 PE \quad (\text{Ec. 7})$$

donde $\beta_0 + \beta_5$ son los coeficientes parciales del polinomio que se estimaron por el análisis de regresión múltiple.

Los resultados se visualizaron a través de las respectivas superficies de respuesta (Montgomery y Peck, 1982).

El efecto significativo de la exposición al amonio sobre la acumulación corporal del tóxico y sobre las respuestas fisiológicas del consumo de oxígeno, la excreción nitrogenada, así como sobre el contenido de agua y el crecimiento de los organismos se determinó utilizando el análisis de varianza de una vía; las diferencias significativas entre los grupos se definieron empleando la prueba de comparación múltiple de Tukey. El nivel de significancia fue determinado en $P < 0.05$, (Zar, 1974).

Para el análisis estadístico se utilizó el programa de cómputo STATGRAPHICS, V-2.1 (Stat. Graph. Syst., 1985-86).

RESULTADOS

En los camarones expuestos a 0.2, 0.4 y 0.6 mg N-NH₃ L⁻¹, la sobrevivencia fué del 100 % al igual que en el grupo testigo, sin adición del contaminante. Por otro lado, la temperatura, la salinidad, el oxígeno disuelto y el pH se mantuvieron constantes durante los periodos de mantenimiento y experimental.

a) Acumulación corporal de amonio.

El contenido corporal de amonio de las postlarvas de *Penaeus vannamei* expuestas durante 4 h, 24 h y 12 d al amonio no ionizado se señala en la Tabla 1.

La exposición de 4 h al tóxico, no modificó el contenido corporal de amonio de los grupos experimentales con respecto al grupo control ($P > 0.05$). En los camarones expuestos 24 h al amonio, la cantidad de amonio corporal del grupo testigo (2.23 mg N-amonio L⁻¹ mg⁻¹ PH) fue similar al observado en los organismos expuestos en 0.2 mg N-NH₃ ($P > 0.05$); en contraste, la cantidad de amonio corporal de los camarones expuestos en 0.4 y 0.6 mg N-NH₃ fue 82 y 72 % respectivamente mayor a la observada en el grupo testigo ($P < 0.05$).

Al aumentar el tiempo de exposición a 12 días, el contenido corporal de amonio de los organismos expuestos a 0.2 y 0.4 mg N-NH₃ L⁻¹ fue similar al grupo testigo ($P > 0.05$); sin embargo, el amonio corporal de las postlarvas expuestas en 0.6 mg N-NH₃ L⁻¹ fue 211, 173 y 107 % mayor al observado en el grupo testigo y en 0.2 y 0.4 m N-NH₃ L⁻¹ respectivamente

Tabla 1. Contenido de amonio corporal (mg N-amonio L⁻¹ mg⁻¹ PH) en postlarvas de *P. vannamei*, expuestas a diferentes concentraciones de amonio no ionizado durante 4 h, 24 h y 12 d. Se señalan valores promedio \pm ES.

N-NH ₃ mg L ⁻¹	Tiempo de exposición		
	4 h	24 h	12 d
0	3.83 ^a (0.63)	2.23 ^a (0.28)	0.36 ^a (0.03)
0.20	3.28 ^a (0.50)	3.53 ^{ab} (0.44)	0.41 ^a (0.06)
0.40	4.74 ^a (0.75)	4.07 ^b (0.69)	0.54 ^a (0.06)
0.60	3.21 ^a (0.32)	3.84 ^b (0.42)	1.12 ^b (0.14)

Letras diferentes en una misma columna denotan diferencias significativas (P < 0.05).

El contenido corporal de amonio (A; mg N-amonio L⁻¹ mg⁻¹ PH) de los organismos expuestos a 0, 0.2, 0.4 y 0.6 mg N-NH₃ (E) y evaluado a las 4 h, 24 h y 12 d se relacionó con el peso corporal de las postlarvas (P; mg PH) mediante el modelo polinomial de 2^o orden:

$$A = \beta_0 + \beta_1 P + \beta_2 E + \beta_3 P^2 + \beta_4 E^2 + \beta_5 P E.$$

Cabe señalar que la relación antes establecida, resulta adecuada para las 4 y 24 horas de exposición al amonio, tiempo en el cual el peso de las postlarvas es independiente de la concentración del tóxico en el medio. Si bien a los 12 días de exposición, el peso de los organismos es influido por el contaminante, los resultados del análisis realizado y las superficies de respuesta generadas, son apropiadas para establecer la relación entre las variables involucradas.

Los coeficientes parciales y estimadores de los polinomios calculados se presentan en la Tabla 2. En todos los casos los modelos fueron significativos ($P < 1 \times 10^{-4}$) con coeficientes de determinación (R^2) de 0.64 a 0.89 dependiendo del tiempo de exposición. El coeficiente de Durbin-Watson (D-W) señaló ausencia de autocorrelación (Montgomery y Peck, 1982).

Las superficies de respuesta generadas de los respectivos polinomios, señalan que a las 4 h de exposición el contenido corporal de amonio en las postlarvas fue similar independientemente de la concentración externa del tóxico (Fig. 2 A; $P > 0.05$). Sin embargo, el peso de los organismos influyó significativamente en el contenido corporal de amonio ($P < 0.05$); las postlarvas de menor peso presentaron un contenido corporal de amonio mayor que las de mayor tamaño (Anexo 1).

A las 24 h de exposición, la acumulación corporal de amonio se relacionó de manera significativa ($P < 0.05$) con el peso de los organismos y las concentraciones experimentales a las que se expusieron las postlarvas, así como con la interacción de los factores (Fig. 2 B; Anexo 1). En los camarones de menor peso la acumulación corporal de amonio fué mayor y se incrementó al aumentar la concentración externa del tóxico, en contraste, en los camarones de mayor peso, la acumulación corporal de amonio fue menor y tendió a disminuir a medida que los niveles del contaminante se incrementaron.

De manera similar, al incrementar el tiempo de exposición a 12 d el contenido corporal de amonio se relacionó ($P < 0.05$) con las concentraciones externas del contaminante, con el peso de las postlarvas así como con la interacción de éstos factores (Fig. 2 C; Anexo 1). En estos organismos, de mayor peso una vez transcurridos 12 d de exposición al tóxico, el contenido corporal de amonio por unidad de peso fue menor que en las postlarvas expuestas al tóxico durante 24 h. Sin embargo, al igual que en este periodo

experimental, el contenido corporal de amonio de las postlarvas expuestas al contaminante por 12 d, fue mayor en los camarones de menor peso. Al aumentar la concentración externa del tóxico, el amonio corporal se incrementó en los camarones de menor peso; en contraste, en las postlarvas de mayor peso el contenido corporal de amonio disminuyó a medida que se incrementaron los niveles del contaminante.

Tabla 2. Coeficientes parciales y estimadores de las ecuaciones polinomiales que relacionan el contenido de amonio corporal (A; mg N-amonio L⁻¹ mg⁻¹ PH) con la concentración externa de amonio no ionizado (E; mg N-NH₃ L⁻¹) y el peso (P; mg PH) de las postlarvas de *P. vannamei*, en diferentes tiempos de exposición:

Coeficientes parciales y estimadores	Tiempo de exposición		
	4 h	24 h	12 d
β_0	11.32	10.07	1.82
β_1	-0.59	-0.81	-0.03
β_2	1.16	17.57	1.78
β_3	0.008	0.018	0.0002
β_4	-3.10	-11.04	0.19
β_5	0.069	-0.470	-0.028
Coeficiente de determinación (R ²)	0.78	0.68	0.74
Coeficiente de Durbin-Watson	1.95	1.56	1.55
ANOVA-F	34.84	20.51	107.29
Nivel de significancia (P)	> 1 x 10 ⁻⁴	> 1 x 10 ⁻⁴	> 1 x 10 ⁻⁴
Grados de libertad (GI)	45	44	52

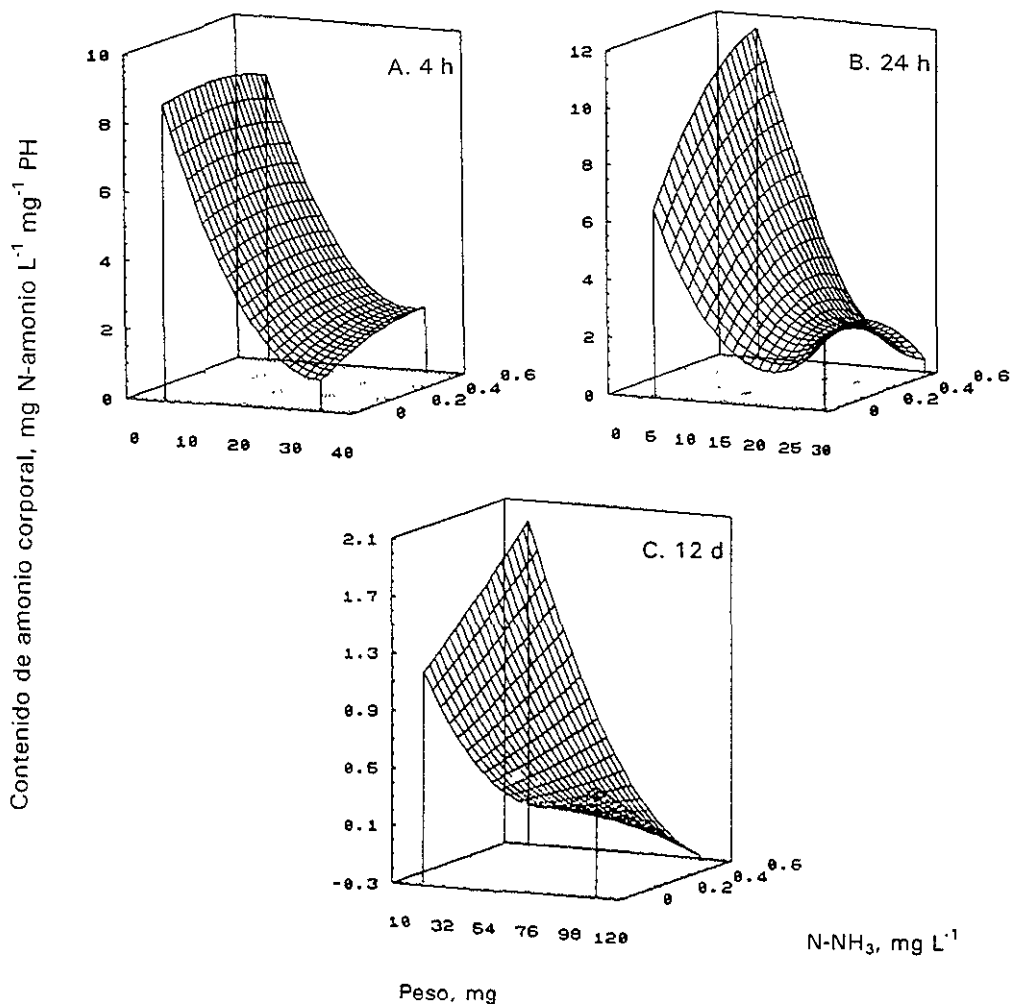


Fig. 2. Superficie de respuesta de la relación entre el contenido de amonio corporal (mg N-amonio L⁻¹ mg⁻¹ PH), el peso de los organismos (mg PH) y la concentración externa del amonio no ionizado (mg N-NH₃ L⁻¹) a la que se expusieron las postlarvas de *P. vannamei* durante 4 h (A), 24 h (B) y 12 d (C).

b.- Excreción nitrogenada

Los valores de la excreción de amonio de las postlarvas de *P. vannamei* se presentan en la Tabla 3 y en la Fig.3. A las 4 horas de exposición al amonio, las postlarvas del grupo testigo presentaron una tasa de excreción de $0.070 \mu\text{g N-amonio h}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ PH}$; por su parte, los grupos experimentales presentaron valores negativos en la tasa de excreción de amonio. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en la tasa de excreción nitrogenada entre los grupos experimentales y el grupo testigo ($P > 0.05$).

De manera similar, después de 24 h y 12 d de exposición al amonio, la excreción de amonio de los organismos expuestos al contaminante presentó valores negativos. En los camarones expuestos 24 h al amonio la tasa de excreción nitrogenada del grupo testigo ($0.075 \mu\text{g N-amonio h}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ PH}$) fué similar a la observada en los organismos expuestos en 0.2 y 0.4 mg N-NH₃ ($P > 0.05$). En contraste, la tasa de excreción de amonio en los camarones expuestos en la mayor concentración (0.6 mg N-NH₃ L⁻¹) fué significativamente menor respecto a la observada en el grupo testigo y en los organismos expuestos a 0.2 y 0.4 mg N-NH₃ L⁻¹ ($P < 0.05$).

En las postlarvas expuestas 12 d al tóxico, la tasa de excreción de amonio de los organismos expuestos a las concentraciones experimentales fue menor ($P < 0.05$) que la observada en el grupo testigo ($0.082 \mu\text{g N-amonio h}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ PH}$). No se observaron diferencias significativas en la excreción nitrogenada de los grupos expuestos al amonio ($P > 0.05$).

Tabla 3. Excreción de amonio ($\mu\text{g N-amonio h}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{PH}$) de las postlarvas de *P. vannamei* expuestas a diferentes concentraciones de amonio no ionizado durante 4h, 24h y 12d. Se señalan valores promedio \pm ES.

N-NH ₃ mg L ⁻¹	Tiempo de exposición		
	4 h	24 h	12 d
0	0.070 ^a (0.005)	0.075 ^a (0.015)	0.082 ^a (0.011)
0.20	-0.129 ^a (0.032)	-0.107 ^a (0.018)	-0.140 ^b (0.028)
0.40	ne	-0.034 ^a (0.221)	-0.085 ^b (0.017)
0.60	-0.125 ^a (0.282)	-0.753 ^b (0.128)	-0.125 ^b (0.102)

Letras diferentes en un misma columna denotan diferencias significativas ($P < 0.05$).
ne = no evaluado

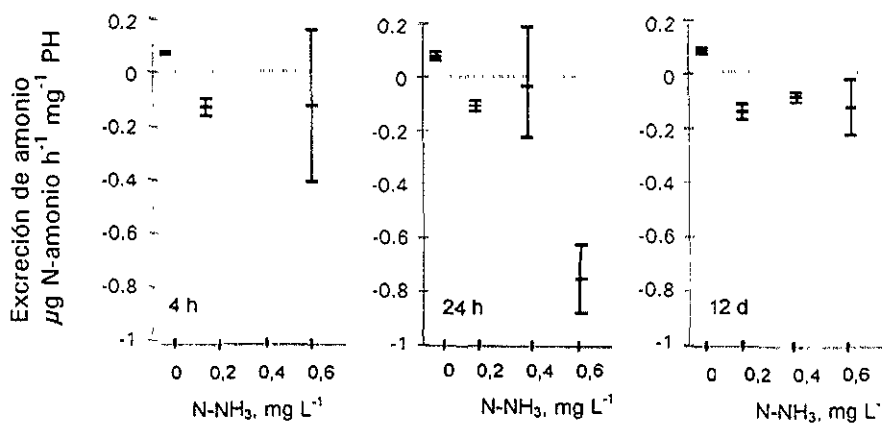


Fig. 3. Excreción de amonio ($\mu\text{g N-amonio h}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{PH}$) de las postlarvas de *P. vannamei* expuestas a diferentes concentraciones de amonio no ionizado durante 4h, 24h y 12d. Se grafican valores promedio \pm ES.

c.- Consumo de oxígeno

La exposición a las diferentes concentraciones de amonio modificaron significativamente la tasa respiratoria de los camarones. El consumo de oxígeno peso específico de las postlarvas expuestas durante 4, 24 horas y 12 días a las diferentes concentraciones del amonio se señalan en la Tabla 4 y en la Fig. 4.

Después de 4 horas de exposición, los organismos expuestos a 0.2 y 0.4 mg N-NH₃ L⁻¹ incrementaron su consumo de oxígeno un 61 y 63 % con respecto al grupo testigo (P<0.05); sin embargo, el consumo de oxígeno de las postlarvas expuestas en 0.6 mg N-NH₃ L⁻¹ fué similar al obtenido en el grupo testigo (P>0.05). A su vez, la tasa respiratoria de los camarones expuestos a la mayor concentración del contaminante fué significativamente menor que la observada en los organismos expuestos a 0.2 y 0.4 mg L⁻¹ (P<0.05).

Al transcurrir 24 h de exposición la tasa respiratoria de las postlarvas de *P. vannamei* de los grupos experimentales se incrementó significativamente con respecto al grupo testigo (P<0.05). El consumo de oxígeno de los grupos expuestos a 0.2, 0.4 y 0.6 mg N-NH₃ L⁻¹ fue 131, 106 y 168 % mayor al observado en el grupo testigo. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre los grupos experimentales (P>0.05).

A diferencia del comportamiento observado en las primeras 24 h de exposición al amonio, la exposición crónica a éste (12 días) redujo significativamente la tasa respiratoria de las postlarvas con respecto al grupo testigo (P<0.05). El consumo de oxígeno de los camarones expuestos a 0.2, 0.4 y 0.6 mg N-NH₃ L⁻¹ fue 31, 38 y 30 % menor que el grupo testigo. No se observaron diferencias significativas en el consumo de oxígeno entre los grupos experimentales (P>0.05).

Tabla 4 Consumo de oxígeno ($\mu\text{g O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ PH}$) de las postlarvas de *P. vannamei* expuestas a diferentes concentraciones de amonio no ionizado durante 4h, 24h y 12d. Se señalan valores promedio \pm ES.

N-NH ₃ mg L ⁻¹	Tiempo de exposición		
	4 h	24 h	12 d
0	0.51 ^a (0.06)	0.48 ^a (0.04)	0.62 ^a (0.03)
0.20	0.82 ^b (0.07)	1.11 ^b (0.13)	0.43 ^b (0.04)
0.40	0.83 ^b (0.12)	0.99 ^b (0.18)	0.38 ^b (0.02)
0.60	0.45 ^a (0.07)	1.29 ^b (0.25)	0.43 ^b (0.16)

Letras diferentes en una misma columna denotan diferencias significativas ($P < 0.05$)

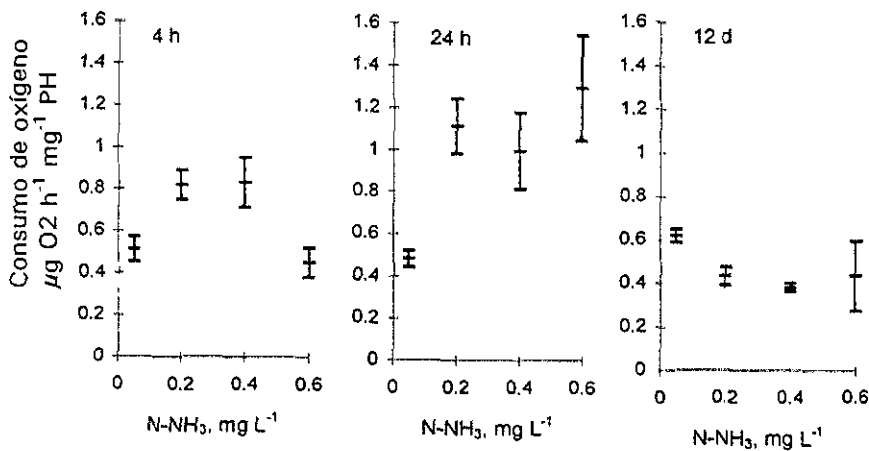


Fig. 4 Consumo de oxígeno ($\mu\text{g O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ PH}$) de las postlarvas de *P. vannamei* expuestas a diferentes concentraciones de amonio no ionizado durante 4h, 24h y 12d. Se grafican valores promedio \pm ES.

d.- Tasa de crecimiento

Los valores del peso húmedo de las postlarvas de *P. vannamei* al inicio (PH i) y término (PH f) de la exposición crónica (12 d) al amonio, así como la tasa de crecimiento absoluto (C), el crecimiento relativo (CR) y la ganancia relativa de peso (GRP) de los camarones expuestos a las diferentes condiciones experimentales se señalan en la Tabla 5 y en la Fig. 5. El peso inicial (PHi, mg) de las postlarvas utilizadas en este trabajo fue similar entre los tratamientos experimentales y el grupo testigo ($P > 0.05$) con valores promedio entre 15.04 a 17.63 mg PH.

Al término del periodo experimental de 12 días los organismos del grupo testigo alcanzaron un peso final de 65.21 mg. En los grupos expuestos al amonio, el peso de los organismos fué modificado por la concentración externa del contaminante ($P < 0.05$); la tasa de crecimiento absoluto (C, mg PH d^{-1}) disminuyó conforme se incrementó la concentración externa del tóxico. El crecimiento de las postlarvas en 0.2 y 0.4 mg $N-NH_3 L^{-1}$ no se modificó significativamente por la presencia del tóxico; sin embargo, en los camarones expuestos en 0.6 mg $N-NH_3 L^{-1}$ la tasa de crecimiento fue 34 % menor respecto al grupo testigo.

En los camarones del grupo testigo, el crecimiento relativo fué del 285 %, mientras que en los camarones expuestos a 0.2, 0.4 y 0.6 mg $N-NH_3 L^{-1}$ el incremento de la biomasa corporal con respecto a su peso inicial fué del 327, 270 y 180 %, respectivamente.

Tabla 5. Peso húmedo inicial (mg, PHi) y final (mg, PHf), tasa de crecimiento absoluto (C; mg PH d⁻¹), crecimiento relativo (CR; %) y ganancia relativa de peso (GRP, %) de las postlarvas de *P. vannamei* expuestas por 12 días a las diferentes concentraciones de amonio no ionizado. Se señalan valores promedio ± ES.

N-NH ₃ mg L ⁻¹	PHi mg	PHf mg	C mg PH d ⁻¹	CR %	GRP %
0	16.91 ^a (1.07)	65.21 ^a (2.79)	4.02	285	100
0.20	15.04 ^a (0.98)	64.37 ^a (3.26)	4.11	327	114
0.40	15.63 ^a (0.98)	57.95 ^{ab} (3.39)	3.52	270	94
0.60	17.63 ^a (0.92)	49.52 ^b (2.24)	2.65	180	63

Letras diferentes en una misma columna denotan diferencias significativas ($P < 0.05$).

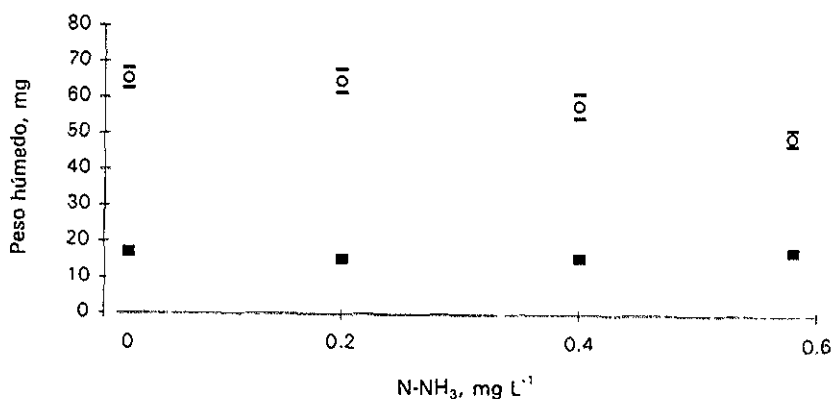


Fig. 5 Peso húmedo (mg PH) de las postlarvas de *P. vannamei* al inicio (-) y término (*) de la exposición crónica de 12 días al amonio no ionizado (N-NH₃, mg L⁻¹). Se grafican valores promedio ± ES.

La ganancia relativa de peso húmedo en las postlarvas (GRP) se relacionó de manera cuadrática con la concentración de amonio no ionizado en el medio externo. La ecuación que describe esta relación es:

$$\text{GRP, \%} = -123.11 (\text{mg N-NH}_3 \text{ L}^{-1})^2 + 110.48 \quad (R^2 = 0.84).$$

A partir de esta ecuación se calcularon las concentraciones efectivas (CE) de amonio no ionizado en la que el crecimiento de los organismos se reduce en un 5 % (CE₅) y 50 % (CE₅₀) respecto al grupo testigo. De esta manera la CE₅ y la CE₅₀ se estimaron en 0.35 y 0.70 mg N-NH₃ L⁻¹, respectivamente, correspondientes a 3.26 y 6.52 mg N-amonio L⁻¹ (Fig. 6).

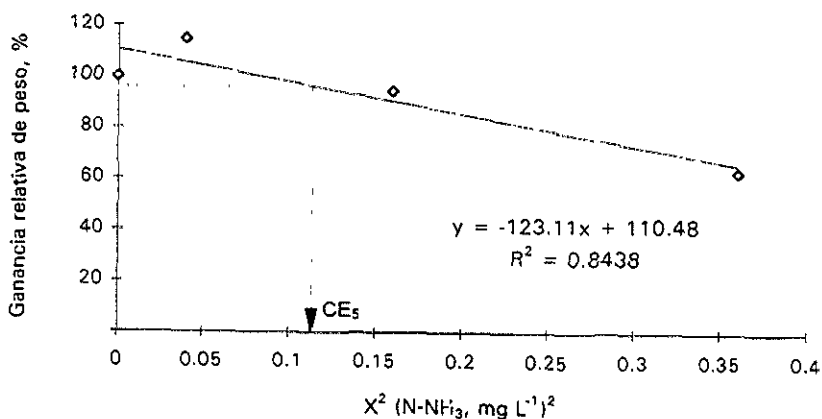


Fig. 6 Ganancia relativa de peso húmedo de las postlarvas de *P. vannamei* expuestas por 12 días a diferentes concentraciones de amonio no ionizado. Se señala la concentración a la cual el crecimiento de los organismos se reduce un 5 % (CE₅) respecto al grupo testigo.

e.- Contenido de agua

El contenido de agua de las postlarvas de *P. vannamei* se evaluó una vez transcurridos los 12 d de exposición al amonio no ionizado. Las postlarvas del grupo testigo presentaron un porcentaje de agua del 80.85 %, mientras que en los grupos expuestos al amonio el contenido relativo de agua varió entre 78.97 y 79.74 % si bien estas diferencias no fueron significativas ($P > 0.05$; Tabla 6).

Tabla 6. Contenido corporal de agua (%) de las postlarvas de *P. vannamei* expuestas a diferentes concentraciones de amonio no ionizado durante 4h, 24h y 12d. Se señalan valores promedio \pm ES.

N-NH ₃ mg L ⁻¹	Contenido de agua (%)
0	80.85 (0.52)
0.20	79.74 (0.46)
0.40	79.58 (0.59)
0.60	78.97 (0.50)

IV. DISCUSION

El eje central de la acuicultura se basa en la producción exitosa de organismos. Sin embargo, esta meta puede verse afectada por el deterioro de la calidad del agua y en particular por la presencia de contaminantes en los sistemas de cultivo. En tales sistemas, el amonio puede convertirse en contaminante al acumularse en concentraciones elevadas ocasionando alteraciones biológicas y en última instancia, la muerte de los organismos.

Al igual que sucede con la mayoría de los contaminantes, el efecto tóxico del amonio se atribuye en gran parte a su acumulación en el medio interno de los organismos (Chen y Chen, 1996). En peneidos, se han reportado concentraciones normales de amonio en la hemolinfa de 7.11 mg N-amonio L⁻¹ en *P. monodon* (Chen y Kou, 1993) y de 8.7 mg N-amonio L⁻¹ en *P. japonicus* (Chen *et al.*, 1994a). En otros crustáceos, estas concentraciones varían (valores recalculados) de 2.01 mg amonio L⁻¹ para *Nephrops norvegicus* (Schimtt y Uglow, 1997), 3.96 mg amonio L⁻¹ para *Cancer pagurus* (Regnault, 1994) a 13.50 mg amonio L⁻¹ para *Callinectes sapidus* (Cameron, 1986).

En el presente estudio, dada la talla de las postlarvas de *P. vannamei* utilizadas no fue posible la obtención de muestras de hemolinfa para la evaluación del amonio interno; por lo que se midió el amonio corporal en el homogenado de los camarones. Los resultados obtenidos si bien deben ser tomados con precaución dado el método utilizado permiten tener una idea aproximada y global de la concentración interna total del amonio en los organismos. Así, es posible suponer que la concentración de amonio en las postlarvas del grupo testigo (0.48 a 3.83 mg N-amonio L⁻¹ mg⁻¹ PH), corresponde al nivel normal del compuesto que es resultado del metabolismo nitrogenado de los organismos y que al no ser eliminado todavía, se encuentra

aun en las estructuras y fluidos corporales. A su vez, la evaluación de la concentración total de amonio en los organismos permitió relacionar la acumulación de amonio corporal con los efectos causados por el incremento del amonio en el medio externo.

El incremento en la concentración del amonio en la hemolinfa de los camarones peneidos cuando estos son expuestos al tóxico, ha sido documentado en varias especies. En *P. japonicus* se ha reportado el incremento significativo de amonio en hemolinfa, de 3.16 mg N-amonio L⁻¹ a 3.98, 5.91 y 9.57 mg N-amonio L⁻¹ después de 2 h de exposición a 0.69, 3.45 y 6.90 mg N-NH₃ L⁻¹ (10, 50 y 100 mg N-amonio L⁻¹) respectivamente (Chen y Kou, 1991). En *P. monodon*, la exposición de 24 h a niveles externos de 1 a 20 mg N-amonio L⁻¹ incrementó el amonio en hemolinfa de 328 a 1412 μmol L⁻¹ (4.59 a 19.77 mg N-amonio L⁻¹) dependiendo de la salinidad del medio (Chen *et al.*, 1994b). El incremento de amonio en hemolinfa por la exposición al amonio externo también ha sido documentado en *P. chinensis* (Chen y Lin, 1992b) y en *Callinectes similis* (Cameron, 1986). De acuerdo a los autores, tal acumulación obedece a la alteración de los mecanismos involucrados en la excreción de productos nitrogenados.

En las postlarvas de *P. vannamei* expuestas al contaminante, la excreción de amonio presentó valores negativos en todas las condiciones experimentales, desde 0.2 mg N-NH₃ L⁻¹ y a partir de las primeras 4 h de exposición. Estos resultados sugieren que a partir de niveles externos de 0.2 mg N-NH₃ L⁻¹ el gradiente normal de difusión del amonio de la hemolinfa de los camarones al medio externo se invierte con el consecuente ingreso del amonio externo al interior de los camarones. De tal manera, la entrada de amonio al interior de los camarones es mayor que su eliminación y por lo tanto pudiera estar enmascarando la excreción de amonio de las postlarvas.

La inversión en el gradiente normal de difusión del amonio relacionado a su vez con valores negativos en la excreción nitrogenada por efecto del incremento del amonio externo ha sido documentado en otros peneidos. En los juveniles de *P. chinensis*, la excreción de amonio presenta valores negativos despues de 4 h de exposición en concentraciones de amonio superiores a 0.38 mg N-NH₃ L⁻¹ (5.1 mg N-amonio L⁻¹) (Chen y Lin,1992b). Este mismo comportamiento se reporta en *P. monodon*, (Chen y Cheng, 1993a; Chen *et al*, 1994b) y en *P. japonicus* (Chen y Cheng, 1993b) en concentraciones superiores a 0.34 mg N-NH₃ L⁻¹ (5 mg N-amonio L⁻¹) despues de 24 h de exposición.

De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente estudio, en las postlarvas de *P. vannamei* expuestas por cuatro horas al amonio, el contenido de amonio corporal no fue modificado por el incremento de amonio en el medio externo. El ingreso del amonio externo al organismo relacionado con los valores negativos en la excreción de amonio sin que esto implique la acumulación corporal del compuesto en las postlarvas durante las primeras horas de exposición sugiere que pueden estar operando mecanismos de transformación o de desintoxicación al amonio como ha sido documentado en otros peneidos. Así es posible que en las postlarvas de *P. vannamei* el amonio corporal "en exceso" es excretado despues de ser transformado a otras formas químicas menos tóxicas como puede ser la urea. Este cambio en el patrón de excreción de tipo amoniotélico a urotélico se ha reconocido en *P. monodon* por la exposición durante 24 h a niveles de amonio ambientales mayores a 4.63 mg N-amonio L⁻¹ (Chen *et al.*, 1994b; Chen y Cheng, 1993a) y en *P. japonicus* (Chen y Cheng, 1993b) a partir de niveles de 5.1 mg N-amonio L⁻¹. Por otro lado, es probable que el amonio pueda ser almacenado temporalmente despues de ser transformado a otros compuestos. Al respecto, Claybrook (1983) y King *et al.* (1985) señalan que el amonio puede ser transformado a glutamato. A su vez, Regnault (1996) sugiere que la síntesis de glucosamina desempeña un

papel importante en la desintoxicación del amonio y contribuye a disminuir los niveles de amonio interno en *Cancer pagurus*. Sin embargo, se requiere profundizar en los mecanismos de regulación y desintoxicación del amonio en *P. vannamei* para dilucidar si tales procesos operan en la especie desde exposiciones tempranas (4 h) a niveles subletales de amonio ambiental.

Ahora bien, al aumentar el tiempo de exposición al amonio la acumulación corporal de éste se observa a partir de 24 h de exposición en niveles externos de $0.4 \text{ mg N-NH}_3 \text{ L}^{-1}$. A su vez los valores negativos de la excreción de amonio sugiere que este compuesto puede ser transformado a otras formas químicas menos tóxicas como la urea y son excretado, como se mencionó previamente. De tal manera, a partir de los resultados obtenidos de la acumulación corporal y de la excreción nitrogenada las postlarvas de *P. vannamei* expuestas al amonio se puede suponer por un lado, que en las primeras horas de exposición al tóxico, los organismos presentan mecanismos encargados de regular el amonio corporal de manera efectiva durante las primeras 4 horas de exposición. Sin embargo, al incrementar el tiempo de exposición al amonio disminuye la efectividad de estos mecanismos con el consecuente incremento de los niveles de amonio corporal.

La acumulación de amonio en las postlarvas de *P. vannamei* puede ser debido a la difusión constante del amonio no ionizado NH_3 del medio externo al interior de los organismos o bien a la difusión o penetración del NH_4^+ en intercambio con el Na^+ como ha sido sugerido en *P. japonicus* (Chen y Kou, 1991) y *P. chinensis* (Chen y Nan, 1992). En *Callinectes similis*, la acumulación del amonio en la hemolinfa obedece fundamentalmente a la entrada pasiva del NH_4^+ y en menor grado al NH_3 (Cameron, 1986). De tal manera, en las postlarvas de *P. Vannamei* ambas formas químicas NH_3 y NH_4^+ pudieran contribuir a la acumulación del amonio en la hemolinfa de los organismos.

En forma evidente, la acumulación de amonio ($\text{mg N-amonio L}^{-1} \text{ mg PH}^{-1}$) en las postlarvas expuestas al tóxico fue mayor en los organismos de menor peso tanto a las 24 h como a los 12 d de exposición al amonio y cuya acumulación fue mayor al incrementarse las concentraciones externas de amonio; así mismo, una vez transcurridos 12 d de exposición crónica al amonio, la acumulación corporal en las postlarvas de mayor peso (PL_{35}) fue de 5 a 6 veces menor que en las postlarvas de 23 días de edad. Estos resultados sugieren que la tasa de incorporación de amonio y por lo tanto su acumulación es función del peso de los organismos. A su vez, es posible suponer que los mecanismos responsables de la excreción y desintoxicación del amonio son más eficientes al incrementarse el peso de los organismos.

La actividad fisiológica de los organismos acuáticos es frecuentemente evaluada a través de uno de sus índices más importantes que es el metabolismo aerobio, el cual puede ser estimado de manera indirecta mediante el consumo de oxígeno (Prosser, 1991). El consumo de oxígeno de las postlarvas de *P. vannamei* del grupo testigo ($0.51 - 0.62 \mu\text{g O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ PH}$) resultó similar a los valores reportados por Villarreal *et al.* (1994) para las postlarvas de la misma especie ($0.61 \text{ mg O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ PH}$) y a los reportados por Robles (1997) para postlarvas de *P. setiferus* ($0.70 \text{ mg O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ PH}$) en condiciones experimentales similares a las del presente trabajo.

El efecto del amonio sobre el consumo de oxígeno de las postlarvas de *P. vannamei* fue evidente desde las primeras 4 h de exposición, generando un incremento en la tasa respiratoria de las postlarvas en concentraciones de 0.2 y $0.4 \text{ mg N-NH}_3 \text{ L}^{-1}$, sin embargo, en la concentración mayor $0.6 \text{ mg N-NH}_3 \text{ L}^{-1}$ el consumo de oxígeno se mantuvo en niveles similares al grupo testigo. Al aumentar el tiempo de exposición a 24 h, la tasa respiratoria de las postlarvas se incrementó conforme se elevó la concentración del tóxico en el medio.

Resultados similares han sido reportados en los juveniles de *P. chinensis*, despues de ser expuestos durante 4 h en concentraciones superiores a 0.036 mg N-NH₃ L⁻¹ (5.09 mg N-amonio L⁻¹) (Chen y Lin, 1992b) y en juveniles de *P. japonicus* despues de 1h de exposición a niveles mayores de 0.34 mg N-NH₃ L⁻¹ (0.95 mg N-amonio L⁻¹) (Chen y Lai, 1992). El incremento gradual en la tasa de consumo de oxígeno conforme se incrementa la concentración externa del tóxico, tambien ha sido señalado en los juveniles de *P. chinensis* despues de 6 h de exposición en concentraciones superiores a 0.30 mg N-NH₃ L⁻¹ (5.53 mg N-amonio L⁻¹); al aumentar el periodo de exposición a 20 h, se observaron cambios significativos en la tasa respiratoria de los camarones a partir de 0.037 mg N-NH₃ L⁻¹ (0.68 mg N-amonio L⁻¹) (Chen *et al.*, 1991).

De manera similar a lo reportado para *P. chinensis* y *P. japonicus* (Chen y Lin, 1992b; Chen *et al.*, 1991; Chen y Lai, 1992) el aumento en la tasa respiratoria de las postlarvas de *P. vannamei* puede relacionarse con las alteraciones observadas en la tasa de excreción de amonio así como con la acumulación del tóxico en el medio interno de los camarones. De tal manera, el incremento en la tasa respiratoria de las postlarvas de *P. vannamei* podría corresponder al aumento en las demandas energéticas globales como resultado de la acción tóxica del amonio. En particular, este incremento en el consumo de oxígeno se podría atribuir al costo energético involucrado tanto en la regulación interna como en los mecanismos involucrados en la desintoxicación del amonio, como es la formación y excreción de urea, donde si bien la conversión del amonio a un compuesto menos tóxico como es la urea posibilita la reducción del efecto tóxico del amonio la síntesis y excreción de urea involucra un costo energético adicional (Hochachka, 1988; Hill y Wise, 1990).

Así mismo, el incremento observado en el consumo de oxígeno durante las primeras 24 horas de exposición, se puede atribuir al gasto energético involucrado en la osmorregulación de los organismos. En este sentido, la alteración en la presión osmótica y la composición iónica por la exposición al amonio han sido reportados en *P. japonicus* (Lin *et al.*, 1993; Chen y Chen, 1996), en *Homarus americanus* y *P. chinensis* (Young-Lai *et al.*, 1991; Chen y Nan, 1992). En *P. Chinensis* tales modificaciones se relacionan con el deterioro de la actividad enzimática de la $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPasa del epitelio branquial (Chen y Nan, 1992).

A diferencia de los resultados obtenidos a las 4 y 24 h de exposición al amonio después de 12 días el consumo de oxígeno de los organismos expuestos al amonio, se redujo significativamente a partir de niveles externos de $0.2 \text{ mg N-NH}_3 \text{ L}^{-1}$. La disminución en la tasa metabólica de las postlarvas de *P. vannamei* puede ser reflejo de la reducción en la actividad locomotora de los organismos debido al efecto neurotóxico del amonio. En peces teleósteos el amonio altera el sistema locomotor y ocasiona nado errático y reducción en la actividad natatoria de los animales (Jobling, 1994; Russo, 1984).

Las diferentes respuestas en la tasa metabólica de las postlarvas de *P. vannamei* en los diferentes periodos de exposición al amonio ambiental, pudieran estar relacionadas con las diferentes etapas de la acción tóxica del amonio en los organismos. De tal manera, en las primeras horas de exposición al amonio el aumento en la tasa metabólica puede ser producto del incremento de la demanda de ATP y por ende de la fosforilación oxidativa relacionados con los mecanismos compensatorios en respuesta a la acción tóxica del contaminante. En una segunda etapa, de intoxicación severa, la disminución en el consumo de oxígeno puede obedecer a la incapacidad del organismo de responder a las demandas del incremento de ATP, que en última instancia

puede conducir a la muerte del organismo. Tales etapas de acción tóxica han sido señaladas en crustáceos por efecto de metales pesados (Gaudy *et al.*, 1991).

El deterioro en el estado de salud de las postlarvas de *P. vannamei* por la exposición crónica al amonio, se reflejó en la reducción de la tasa de crecimiento de los camarones. El crecimiento como respuesta integrativa en los organismos acuáticos ha sido considerado un indicador de amplio espectro, que refleja el efecto global de las condiciones ambientales sobre la integridad fisiológica de los organismos (Beamish *et al.*, 1975). Por lo tanto, ha sido considerado un indicador adecuado de la condición fisiológica y de salud de la población, lo cual es de gran importancia en acuicultura (Tomasso, 1996).

En organismos acuáticos el incremento de biomasa corporal (peso seco) es uno de los parámetros más confiables para medir el crecimiento. Sin embargo, cuando el peso húmedo de los animales no se ve modificado por las condiciones ambientales, este estimador puede resultar adecuado para medir el crecimiento (Weatherley, 1990). En el presente trabajo, la exposición a las diferentes concentraciones de amonio durante 12 días no modificó el contenido de agua de las postlarvas de camarón por lo cual es posible considerar que el incremento en el peso húmedo reflejó el crecimiento de los animales.

En las postlarvas de *P. vannamei* del grupo testigo la tasa diaria de crecimiento ($4.02 \text{ mg PH d}^{-1}$) fue 47 % mayor a la evaluada en las postlarvas de *P. setiferus* ($2.14 \text{ mg PH d}^{-1}$) en condiciones experimentales semejantes a las usadas en este estudio (Robles, 1997) y 83 % mayor que la reportada en postlarvas de *P. duorarum* mantenidas en 28°C y 38 ‰ (Gaxiola, 1994).

La exposición crónica al amonio, redujo el crecimiento de las postlarvas de *P. vannamei* en concentraciones mayores a $0.4 \text{ mg N-NH}_3 \text{ L}^{-1}$. De tal manera, la exposición prolongada a $0.6 \text{ mg N-NH}_3 \text{ L}^{-1}$ redujo un 34 % el crecimiento de los camarones. La reducción en la tasa de crecimiento de las postlarvas de *P. vannamei* pudo ser consecuencia de la reducción en el consumo de alimento, ya que al aumentar la concentración del tóxico en el medio fue evidente el incremento del alimento remanente no consumido por los camarones y la disminución en la actividad locomotora de los organismos. De tal manera y dado el carácter neurotóxico del amonio es posible que ocasione alteraciones nerviosas relacionadas con el comportamiento locomotor de los camarones afectando la búsqueda e incorporación del alimento y en consecuencia altere el crecimiento de las postlarvas de *P. vannamei*.

La reducción en la tasa de crecimiento por la exposición crónica al amonio ha sido documentada en otros peneidos. En postlarvas de *P. setiferus*, la exposición a $0.7 \text{ mg N-NH}_3 \text{ L}^{-1}$ ($8.2 \text{ mg N-amonio L}^{-1}$) por 5 días disminuye el crecimiento un 97 % (Robles, 1997), en tanto que en postlarvas de *P. monodon* expuestas por 16 días, niveles de 3 mg L^{-1} de amonio reduce el crecimiento y disminuye la sobrevivencia de los camarones (Noor-Hamid *et al.*, 1994). Así mismo, Chen y Lin (1992a) reportan una disminución del 23 % en el crecimiento de los juveniles de *P. penicillatus* después de 42 días de exposición a $0.60 \text{ mg N-NH}_3 \text{ L}^{-1}$ y del 17 % a los 14 días en $0.90 \text{ mg N-NH}_3 \text{ L}^{-1}$.

En los sistemas de producción resulta fundamental conocer los límites de seguridad al amonio, que permitan garantizar la sobrevivencia, el desarrollo y el crecimiento adecuado de los organismos. En este sentido, los estudios de la exposición crónica al amonio, permiten determinar las concentraciones que ocasionan la reducción del 5 y del 50 % del crecimiento de los organismos (CE_5

y CE_{50}); Las concentraciones efectivas CE_5 y CE_{50} han sido consideradas indicadores adecuados del efecto tóxico del amonio sobre el crecimiento de los organismos (Allan *et al.*, 1990). A su vez la evaluación de la CE_5 permite establecer un nivel de seguridad de la concentración de amonio en el medio externo.

En las postlarvas de *P. vannamei* expuestas durante 12 días a concentraciones subletales de amoniaco los valores de CE_5 y CE_{50} se estimaron en 0.35 y 0.70 mg N-NH₃ L⁻¹, respectivamente. De acuerdo con la literatura la CE_{50} es varias veces mayor que la CE_5 . Por ejemplo la CE_{50} para *P. setiferus* es de 0.16 mg N-NH₃ L⁻¹, mientras que la CE_5 estimada para estos organismos es de 0.014 mg N-NH₃ L⁻¹. El hecho de que en las postlarvas de *P. vannamei* los valores de la CE_5 y CE_{50} no den cuenta de la diferencia en orden de magnitud que se esperaría indica que en esta especie la reducción en la tasa de crecimiento por efecto de concentraciones menores a 0.6 mg N-NH₃ L⁻¹ no es tan drástica como para otras especies de peneidos lo cual sugiere una mayor tolerancia al amonio.

Por su parte, los valores de CE_{50} de amonio propuestos por Wickins (1976) para cuatro especies de peneidos en estado juvenil *P. japonicus*, *P. occidentalis*, *P. schmitti* y *P. semisulcatus* una postlarval *P. setiferus* después de tres semanas de exposición al tóxico fueron 0.37, 0.40, 0.69, 0.22 y 0.59 mg N-NH₃ L⁻¹ respectivamente, con un valor promedio de 0.45 mg N-NH₃ L⁻¹. Jayasankar y Muthu (1983) reportan un valor de CE_{50} de 0.25 mg N-NH₃ L⁻¹ para las postlarvas de *P. indicus* expuestas por 9 días al tóxico. En postlarvas y juveniles de *P. setiferus* expuestos por 5 y 10 días al amonio, los valores de CE_{50} obtenidos fueron de 0.16 y 0.70 mg N-NH₃ L⁻¹, respectivamente (Robles, 1997). Así mismo, Chen y Lin (1992a) establecen un valor de 0.76 mg L⁻¹ para los juveniles de *P. penicillatus* en exposición a 56 días.

El valor de CE_{50} obtenido en este trabajo para las postlarvas de *P. vannamei* (0.70 mg N-NH₃ L⁻¹) resulta mayor o similar que los reportados para las postlarvas de otros peneidos y mayor al reportado para la mayoría de los juveniles de otras especies de peneidos. Estos resultados sugieren que el efecto tóxico del amonio sobre las postlarvas de *P. vannamei* es menor que el reportado para otras especies.

Con respecto a los niveles de amonio sugeridos para garantizar el crecimiento adecuado de los organismos en cultivo (CE_5), Robles (1997) sugiere valores de 0.014 y 0.2 mg N-NH₃ L⁻¹ para postlarvas y juveniles de *P. setiferus* respectivamente. Wickins (1976) establece de manera general niveles de seguridad de 0.09-0.11 mg N-NH₃ L⁻¹, los cuales reducen el crecimiento de los organismos en 1 a 2 % (CE_{1-2}). A su vez, Allan *et al.*, (1990) proponen concentraciones aceptables de 0.35 y 0.21 mg N-NH₃ L⁻¹ (CE_5) para los juveniles de *M. macleayi* y *P. monodon*, respectivamente expuestos durante 21 días al tóxico.

Por otro lado, a partir de pruebas de toxicidad aguda al amonio se proponen niveles de seguridad para las postlarvas y nauplios de *P. monodon* en 0.10 y 0.01 mg N-NH₃ L⁻¹ respectivamente (Chin y Chen, 1987). Para los juveniles de *P. monodon* (Chen *et al.*, 1990) y *P. penicillatus* (Chen y Lin, 1991a) se sugieren concentraciones aceptables de 0.08 y 0.24 mg N-NH₃ L⁻¹, respectivamente, de 0.032 mg N-NH₃ L⁻¹ en postlarvas de *P. paulensis* (Ostrensky *et al.*, 1992) y de 0.04 mg N-NH₃ L⁻¹ en larvas de *P. chinensis* (Chen y Lin, 1991a).

En contraste con los valores señalados, la concentración a la cual se

reduce un 5 % el crecimiento de las postlarvas de *P. vannamei* ($CE_5 = 0.35$) expuestas 12 días al amonio es mayor a la reportada para el mismo estadio en otras especies de peneidos y mayor o similar a la propuesta para el estadio juvenil de diferentes especies. De tal manera, si bien el amonio en concentraciones por arriba de $0.4 \text{ mg N-NH}_3 \text{ L}^{-1}$ ($4.54 \text{ mg N-amonio L}^{-1}$) modifica el crecimiento de las postlarvas de *P. vannamei*, este efecto no resulta tan drástico como para otras especies.

Así, los resultados obtenidos de la CE_5 y CE_{50} sugieren que las postlarvas de *P. vannamei* son más tolerantes al efecto tóxico crónico del amonio que otras especies de peneidos, lo cual permite garantizar su crecimiento adecuado, aún en condiciones menos favorables que para otras especies. Así, la CE_5 obtenida para las postlarvas de *P. vannamei* $0.35 \text{ mg N-NH}_3 \text{ L}^{-1}$ ($3.26 \text{ mg N-amonio L}^{-1}$) puede considerarse como la concentración máxima aceptable en ambientes de cultivo, sin un detrimento significativo en el crecimiento de los camarones.

V. CONCLUSIONES

La concentración de amonio corporal por unidad de peso en las postlarvas de *P. vannamei* es influida por el peso de los organismos, independientemente de la concentración externa de amonio y del tiempo de exposición, siendo mayor en los camarones de menor peso.

En las postlarvas de *P. vannamei*, la tasa de excreción de amonio presenta valores negativos en organismos expuestos desde 0.2 mg N-NH₃ L⁻¹ y a partir de 4 horas de exposición al amonio, lo cual sugiere la entrada de amonio al interior de los camarones. Sin embargo, la acumulación corporal del contaminante en las postlarvas se observa al aumentar el tiempo de exposición a 24 h y 12 d, y conforme aumenta la concentración externa de amonio.

Los resultados obtenidos sugieren en las postlarvas de *P. vannamei* la participación de mecanismos de transformación, almacenamiento y eliminación del amonio. Tales mecanismos son aparentemente más eficaces durante las primeras 4 h de exposición, reduciéndose su eficiencia al incrementarse el tiempo de exposición con el consecuente incremento del amonio en el medio interno de los camarones.

Las respuestas observadas en el consumo de oxígeno de las postlarvas de *P. vannamei* en los diferentes períodos de exposición al contaminante, puede estar relacionada con las etapas de acción tóxica subletal del amonio en los organismos. De tal manera, el aumento en la tasa metabólica durante las primeras 24 h de exposición se asocia con incremento del gasto energético relacionado con los procesos de excreción y desintoxicación del amonio,

mientras que en la segunda etapa, de intoxicación severa, la disminución en el consumo de oxígeno resulta de la incapacidad del organismo de responder a las demandas del incremento de ATP y a la disminución en la actividad general de los organismos.

El efecto tóxico de la exposición crónica al amonio se vio reflejado en la reducción de la tasa de crecimiento de las postlarvas de *P. vannamei*; en concentraciones superiores a $0.4 \text{ mg N-NH}_3 \text{ L}^{-1}$ se observó la disminución del 34 % del crecimiento de los organismos.

Las concentraciones a las cuales el crecimiento de las postlarvas se reduce en 5 % (CE_5) y 50 % (CE_{50}), respecto al grupo testigo, se estimaron en 0.35 y $0.70 \text{ mg N-NH}_3 \text{ L}^{-1}$ (3.26 y $6.52 \text{ mg N-AT L}^{-1}$) respectivamente.

El amonio puede convertirse en contaminante al acumularse en concentraciones elevadas en los sistemas de cultivo, ocasionando en los organismos alteraciones a nivel bioquímico, fisiológico y conductual. De acuerdo a los resultados obtenidos las postlarvas de *P. vannamei* resultan más resistentes que las postlarvas de otras especies de peneidos al incremento de las concentraciones externas de amonio.

VI. LITERATURA CITADA

- Allan, G. L., G. B. Maguire and S. J. Hopkins. 1990. Acute and chronic toxicity of ammonia to juvenile *Metapenaeus macleayi* and *Penaeus monodon* and the influence of low dissolved-oxygen levels. *Aquaculture*. 91: 265-280.
- Alcaraz, Z. G., X. Chiappa and C. Vanegas. 1997. Temperature tolerance of *Penaeus setiferus* postlarvae exposed to ammonia and nitrite. *Aquat. Toxicol.* 27: 345-353.
- Anthoniesen, A., R. Loehr, T. Prakasam, E. Srinath. 1976. Inhibition of nitrification by ammonia and nitrous acid. *J. WPCF* 48 (5):835-852.
- Beamish, F. W. H., A. J. Nimi and P. F. K. P. Leet. 1975. Bioenergetic of teleost fishes: Environmental influence. In: Bolis L., H P. Madreelli and K. Schmidt-Nielsen (Eds.) *Comparative Animal Functional. Aspects of Structural Materials*. North-Holland Pub. Co. Amsterdam.
- Bower, C. E., and Bidwell. 1978. Ionization of ammonia in seawater: effects of -temperatura, pH, and salinity. *J. Fish. Res. Board Can.* 35: 1012-1016.
- Busacher, G. P., Y. R. Adelman and E. M. Goolish. 1990. Growth. p. 363-387. In: Schreck C. B. and P. B. Moyle (Eds.). *Methods for Fish Biology*. Am. Fish. Soc. U.S.A.
- Cameron, J. N. 1986. Responses to reversed NH_3 and NH_4^+ gradients in a teleost (*Ictalurus punctatus*), an elasmobranch (*Raja erinacea*), and a crustacean (*Callinectes sapidus*): evidences for NH_4^+/H^+ exchange in the teleost and the elasmobranch. *J. Exp. Zool.* 239: 183-195.
- Campbell, J. W. 1973. Nitrogen excretion. p. 279-316. In: Prosser, C. L. (Ed.). *Comparative Animal Physiology*. W. B. Saunders, Philadelphia
- Cech, J. J. 1995. Respirometry. p. 335-362. In: Scheck, C. B. and P. B. Moyle (Eds.). *Methods for Fish Biology*. Am. Fish. Soc. USA.

- Chen, J. C. and C. T. Chen, 1996. Changes of osmotic and electrolyte concentrations in the haemolymph of *Penaeus japonicus* exposed to ambient ammonia. *Comp. Biochem. Physiol.* 114C (1): 35-38.
- Chen, J. C., C. T. Chen and S. Y. Cheng. 1994b. Nitrogen excretion and changes of hemocyanin, protein and free amino acid levels in the hemolymph of *Penaeus monodon* exposed to different concentrations of ambient ammonia-N at different salinity levels. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 110: 85-94.
- Chen, J. C. and S. Y. Cheng, 1993a. Hemolymph PCO₂, hemocyanin, protein levels and urea excretion of *Penaeus monodon* exposed to ambient ammonia. *Aquat. Toxicol.* 27: 281-292.
- Chen, J. C. and S. Y. Cheng, 1993b. Haemolymph osmolality, acid-base balance and shift of ammonotelic to ureotelic excretory pattern of *Penaeus japonicus* exposed to ambient ammonia. *Comp. Biochem. Physiol.* 106C (3): 733-737.
- Chen, J., S. Cheng and C. Chen. 1994a. Changes of haemocyanin, protein and amino acid levels in the haemolymph of *Penaeus japonicus* exposed to ambient ammonia. *Comp. Biochem. Physiol.* 109A (2): 339-347.
- Chen, J. C. and Y. Z. Kou. 1991. Accumulation of ammonia in the haemolymph of *Penaeus japonicus* exposed to ambient ammonia. *Dis. Aquat. Org.* 11:187-191.
- Chen, J. and Y. Kou. 1992. Effects of ammonia on growth and molting of *Penaeus japonicus* juveniles. *Aquaculture* 104: 249-260.
- Chen, J. C. and Y. Z. Kou. 1993. Accumulation of ammonia in the haemolymph of *Penaeus monodon* exposed to ambient ammonia. *Aquaculture* 109: 177-185.
- Chen J. C. and S. H. Lai. 1992. Oxygen consumption and ammonia-N excretion of *Penaeus japonicus* adolescents exposed to ambient ammonia. *Comp. Biochem. Physiol.* 102 C (1): 129-133.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

- Chen, J. C. and C. Y. Lin. 1991a. Lethal doses of ammonia on *Penaeus chinensis* Larvae. *Bull. Inst. Zool., Acad. Sinica*. 30(4): 289-297.
- Chen, J. and J. N. Lin. 1991b. Lethal and sublethal effects of ammonia to *Penaeus penicillatus* juveniles. *Bull. Inst. Zool. Acad. Sinica*. 30 (2): 73-80.
- Chen, J. and C. Lin. 1992a. Effect of ammonia on growth and molting of *Penaeus penicillatus* juveniles. *Comp. Biochem. Physiol.* 101 C (3): 446-447.
- Chen, J. and C. Lin. 1992b. Oxygen consumption and ammonia-N excretion of *Penaeus chinensis* juveniles exposed to ambient ammonia at different salinity levels. *Comp. Biochem. Physiol.* 102 C (2): 287-291.
- Chen, J. and F. Nan. 1991. Lethal effects of nitrite on *Metapenaeus ensis* larvae. *J. World Aquac. Soc.* 22 (1): 51-56.
- Chen, J. and F. Nan. 1992. Effect of ambient ammonia on ammonia-N excretion and ATPase activity of *Penaeus chinensis*. *Aquat. Toxic.* 23: 1-10.
- Chen, J. C., F. H. Nan and C. M. Kuo. 1991. Oxygen consumption and ammonia-N excretion of prawns (*Penaeus chinensis*) exposed to ambient ammonia. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 21: 377-382.
- Chen, J., L. Ping, and S. Lei. 1990. Toxicities of ammonia and nitrite to *Penaeus monodon* adolescents. *Aquaculture* 89: 127-137.
- Chin, T. S. and J. C. Chen. 1987. Acute toxicity of ammonia to larvae of the tiger prawn, *Penaeus monodon*. *Aquaculture*. 66: 247-253.
- Claybrook, D. L. 1983. Nitrogen Metabolism. p. 163-213. In: Bliss, D. E. and L. H. Mantel (Eds.). *The Biology of Crustacea. Internal Anatomy and Physiological Regulation*. Academic Press. N. Y., U.S. A.

- Espinoza, L. V. 1998. Efecto tóxico agudo de compuestos nitrogenados y niveles limitantes de oxígeno en postlarvas de camarón blanco *Penaeus setiferus* (Linnaeus, 1769). Tesis de Maestría, Facultad de Ciencias, UNAM. México. 45
- 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. A. 1994. Requerimientos nutricionales de las postlarvas y juveniles de *Penaeus setiferus* *P. duorarum* (Crustacea: Penaeidae). Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias, UNAM. México. 110 pp.
- Hill, R. W. and G. A. Wyse. 1990. *Animals Physiology*. HarperCollins, Pub. N. Y., U.S.A. 656 pp.
- Hochachka, S. 1988. *Strategies of Biochemical Adaptation*. Cambridge University Press. Great Britain. 358 pp.
- Jayasankar, P. and M. Muthu. 1983. Toxicity of nitrite to the larvae of *Penaeus indicus*. *Indian J. Fish.* 30: 231-240.
- Jobling, M. 1994. *Fish Bioenergetics*. Chapman and Hall. Londres. G.B. 309 pp.
- King, F. D., T. L. Cucci and R. R. Bidigare. 1985. A pathway of nitrogen metabolism in marine decapod crabs. *Comp. Biochem. Physiol.* 80b (3) 401-403.
- Kormanik, G. A. and J. N. Cameron. 1981. Ammonia excretion in animals that breathe water: A review. *Mar. Biol. Letters.* 2: 11.23.
- Lawrence, A. L., J. P. McVey and J. V. Huner. 1985. Penaeid Shrimp Culture. p. 130-135. In: J. V. Huner and E. Van Brown (Eds.). *Crustacean and Mollusk Aquaculture in the United States*. AVI Pub.

- Lin, H., P. Thuet, J. Trilles, R. Mounet-Guillaume and G. Charmantier. 1993. Effects of ammonia on survival and osmoregulation of various development stages of the shrimps *Penaeus japonicus*. *Mar. Biol.* 117:591-598.
- Martínez, C. 1993. *Camaronicultura. Bases técnicas y científicas para el cultivo de camarones peneidos*. A.G.T Editor, S.A. México. 233pp
- Montgomery, D. C. and E. A. Peck. 1982. *Introduction to Linear Regression Analysis*. Wiley and Son. N. Y. 504 pp.
- Noor- Hamid, S., R. D. Fortes and F. Parado-Esteba. 1994. Effect of pH and ammonia on survival and growth of the early larval stages of *Penaeus monodon* Fabricius. *Aquaculture*. 125: 67-72.
- Ostrensky, A., M. A. Marchiori and L. H. Poersch. 1992. Toxicidade aguda da amônia no processo produtivo de pós-larvas de *Penaeus paulensis* Pérez-Farfante, 1967. *An Acad. Bras. Ci.* 64 (4): 383-389.
- Ostrensky, A. and W. Wasidesky Jr, 1995. Acute toxicity ammonia to various life stages of the Sao Paulo shrimp, *Penaeus paulensis*. *Aquaculture*. 132: 339-347.
- Piña, C., X. Chiappa, G. Alcaraz, y C. Vanegas. 1997. Toxicidad aguda de compuestos nitrogenados y respiración en niveles decrecientes de oxígeno disuelto en *Penaeus setiferus* y *P. vannamei*. *XIV Congreso Nacional de Zoología*. Guanajuato, Gto. México.
- Prosser, L. 1991. *Environmental and Metabolic Animal Physiology*. Wiley-Liss, Inc. Pub. New York. 578 pp.
- Regnault, M. 1987. Nitrogen excretion in marine and fresh-water crustacea. *Biol. Rev.* 62:1-24.
- Regnaut, M. 1994. Effect of air exposure on ammonia excretion and ammonia content of branchial water of the crab *Cancer pagurus* J. *Exp. Zool.* 268: 208-217.

- Regnault, M. 1996. Air exposure-induced increase in acetylglucosamine content of some soft tissues and haemolymph of a crab (*Cancer pagurus*). *J. Exp. Zool.* 275: 421-430.
- Rodier, J. 1981. *Análisis de las aguas*. Omega. Barcelona. 504 pp.
- Russo, R. C. 1984. Ammonia, nitrite and nitrate. p. 455-474. *In*: Rand, G. and S. Petrocelli (Eds.). *Fundamentals of Aquatic Toxicology*. Hemisphere Pub. Co. N.Y.
- Robles, C., 1987. Alteraciones fisiológicas de postlarvas y juveniles del camarón blanco *Penaeus setiferus* (Crustacea:Decapoda) por efecto del amoniaco. Tesis de licenciatura en Biología. Facultad de Ciencias. UNAM. 38 pp.
- Schmidt-Nielsen, K. 1990. *Animal Physiology: Adaptation and Environmental*. Cambridge University Press. 602 pp.
- Schmitt, A. S. and R. F. Uglow, 1997. Effects of ambient ammonia levels on blood ammonia, ammonia excretion and heart and scaphognathite rates of *Nephrops norvegicus*. *Mar. Biol.* 127: 411-418.
- SEMARNAP. 1996. *Anuario Estadístico de Pesca*. Dirección General de Estadística e Informática. Secretaría de Medio Ambiente Recursos Naturales y Pesca. México. 365 pp.
- Smith, K. 1988. Grado de conocimiento del recurso camarón del Golfo de México, una perspectiva en la ocasión del XXV aniversario del INP. *In*: *Los Recursos Pesqueros del País*. Secretaria de Pesca-Instituto Nacional de la Pesca. 650 pp.
- Spotte, S. 1979. *Fish and Invertebrate Culture*. Wiley-Interscience. Pub. John. Wiley and Son. N. Y. 179 pp.
- Tomasso, J. R. 1996. Environmental requirements of aquaculture animals: a conceptual summary. *W. Aquac.* 27 (2): 27-31.

- UNEP/FAO/IADEA. 1987. Test of the acute lethal toxicity of pollutants to marine fish and invertebrates. *Reference Methods for Marine Pollution studies*. No. 43 (draft). UNEP. 23 p.
- Villarreal, H., P. Hinojosa and J. Naranjo. 1994. Effect of temperature and salinity on the oxygen consumption of laboratory produced *Penaeus vannamei* postlarvae. *Comp. Biochem. Physiol.* 108: 331-336.
- Weatherley, A. H. 1990. Approaches to understanding fish growth. *Trans. Am. Fish. Soc.* 119: 662-672.
- Wickins, J. F. 1976. The tolerance of warm-water prawns to recirculated water. *Aquaculture*. 9: 19-37.
- Young-Lai, W. W; M. Charmantier-Daures and G. Charmantier. 1991. Effect of ammonia on survival and osmoregulation in different life stages of the lobster *Homarus americanus*. *Mar Biol.* 110:293-300.
- Zar, J.H., 1989. *Biostatistical Analysis*. Prentice-Hall. N. Y. 620 pp.

VII. ANEXO

Tabla A. Coeficientes parciales y estimadores del modelo polinomial de 2^{do} orden $A = \beta_0 + \beta_1 P + \beta_2 E + \beta_3 P^2 + \beta_4 E^2 + \beta_5 PE$, que relacionan el contenido de amonio corporal (A; mg N-ATc L⁻¹ mg⁻¹ PH) en función de la concentración externa de amoniaco (E; mg N-NH3 L⁻¹) y el peso (P; mg PH) de las postlarvas de *P. vannamei*, en diferentes tiempos de exposición. A. 4h; B. 24 h; C. 12 d.

Variable	Coefficientes parciales	Error standard	t	P
A. 4 h				
Constante, A	11.3201	1.0678	10.6012	0.0000
Concentración, E	1.1681	2.4721	0.4725	0.6391
Concentración, E ²	-3.1037	3.2731	-0.9483	0.3487
Peso, P	-0.5959	0.1172	-5.0816	0.0000
Peso, P ²	0.0084	0.0029	2.8474	0.0069
Interacción, E P	0.0690	0.0832	0.8405	0.4056
B. 24 h				
Constante	10.0688	2.2159	4.5437	0.0001
Concentración, E	17.5778	3.3830	5.1958	0.0000
Concentración, E ²	-11.0485	3.7875	-2.9171	0.0058
Peso, P	-0.8125	0.2721	-2.9855	0.0049
Peso, P ²	0.0186	0.0077	2.3967	0.0214
Interacción, E P	0.4707	0.1469	-3.2030	0.0027
C. 12 d				
Constante	1.8292	0.40117	4.5596	0.0000
Concentración, E	1.7837	0.78931	2.2599	0.0285
Concentración, E ²	-0.0375	0.59537	-0.3281	0.7443
Peso, P	-0.0375	0.01024	-3.6701	0.0006
Peso, P ²	0.0002	0.00006	3.5869	0.0008
Interacción, E P	-0.0283	0.00894	-3.1718	0.0027