

00344

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

13



FACULTAD DE CIENCIAS  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

“EFECTO SUBLETAL DEL AMONIO SOBRE  
JUVENILES DE *Litopenaeus setiferus*  
(CRUSTACEA: DECAPODA).”

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS  
(BIOLOGIA DE SISTEMAS Y RECURSOS ACUATICOS)

P R E S E N T A .  
BIOL. CECILIA ROBLES MENDOZA

DIRECTORA DE TESIS DRA RUTH CECILIA VANEGAS PEREZ



MEXICO, D. F.

2001



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 de la UNAM, bajo la dirección de la Dra. Ruth Cecilia Vanegas Pérez.

## DEDICATORIAS

*A mis padres: Sr. Santiago Robles y Sra. Guadalupe Mendoza  
Por enseñarme a alcanzar mis sueños y que con su apoyo y cariño  
me ayudaron a obtener este nuevo logro.*

*A mis hermanos: Lety, Fredy y Ale  
Por su cariño y por sus palabras de ánimo a todo momento*

*Gracias por significar lo más importante de mi vida!*

## AGRADECIMIENTOS

A mi directora de Tesis: Dra. Ruth Cecilia Vanegas Pérez por haberme confiado el desarrollo del presente trabajo. Así como por su disponibilidad e interés que siempre ha demostrado en mi desarrollo y superación académica y por sus palabras de aliento en todo momento que las he necesitado. Pero sobre todo por su amistad. Mil gracias!!!

A los miembros de mi comité tutorial:

Dra. Guillermina Alcaraz Zubeldía, por sus comentarios y sugerencias a lo largo del desarrollo de la presente tesis.

Dr. René Cárdenas Vázquez por su apoyo y sugerencias en la parte bioquímica.

Dr. Xavier Chiapa Carrara por su apoyo en el análisis estadístico.

A los miembros del sínodo:

Dra. Guillermina Alcaraz Zubeldía, Dra. Gabriela Gaxiola Cortes, Dra. Elva Escobar Briones, Dr. René Cárdenas Vázquez, Dr. Xavier Chiapa Carrara y Dr. Singaraju Sarma por sus valiosos comentarios que permitieron enriquecer el presente trabajo.

A la Dirección General de Estudios de Posgrado de la UNAM por la beca otorgada para realizar mis estudios de Maestría, así como a la Dirección General de Apoyo al Personal Académico por la beca de apoyo del Proyecto de Investigación (PAPIIT IN 2177999).

A la Facultad de Ciencias de la UNAM por el apoyo institucional brindado durante mi desarrollo académico y profesional.

Al Coordinador del Posgrado de Ciencias del Mar y Limnología Dr. Martín Merino por el apoyo en la parte final de mis estudios de Maestría. Así como al personal administrativo del mismo posgrado, en especial a la Sec. Aux. Norma Suazo.

Al personal del Laboratorio de Biología Marina Experimental de la Facultad de Ciencias, en especial al Dr. Carlos Rosas, a la Dra. Gabriela Gaxiola y al M. en C. Adolfo Sánchez por el préstamo de sus instalaciones durante la captura de los organismos empleados. Así como a Fabián, a Gaby P. y a Adrianita por su apoyo y hospitalidad brindada.

A los miembros del equipo de trabajo: Cecy, Lalo y Luz por el apoyo en la parte experimental y a Susy, Rosy y Sebas por su apoyo y comprensión en el término del presente trabajo.

A Catalina Maldonado, Hugo Molina y Verónica Lemus por su valioso apoyo en la parte experimental.

A Purina S. A. en especial a Jesús Cendejas y a David Montañón por la donación del alimento empleado

## INDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCION	2
OBJETIVOS	5
MATERIALES Y METODOS	5
1. Captura y mantenimiento	5
2. Pruebas de toxicidad	6
3. Respuestas fisiológicas y bioquímicas	8
a) Consumo de oxígeno	8
b) Excreción Nitrogenada	10
c) Acumulación de amonio y urea en hemolinfa	11
d) acumulación de amonio y urea en tejido	12
e) Concentración iónica y osmótica en hemolinfa	12
f) Actividad de la arginasa	13
4. Análisis estadístico	14
RESULTADOS	15
1. Consumo de oxígeno	15
2. Excreción nitrogenada	19
3. Medio interno	21
a) Concentración de amonio y urea	21
b) Presión osmótica	25
c) Iones	27
4 Análisis de tejido	29
a) Amonio	29
b) Urea	33
5. Actividad de la arginasa	35
DISCUSION	40
CONCLUSIONES	49
LITERATURA CITADA	51
ANEXO	56

## RESUMEN

En los sistemas de cultivo intensivos y semi-intensivos de camarones peneidos, la acumulación de amonio es uno de los principales procesos que desencadenan alteraciones en los organismos a nivel bioquímico, fisiológico y conductual, disminuyendo la producción del recurso acuático. En el presente trabajo se evaluó el efecto subletal del amonio en juveniles de *Litopenaeus setiferus*, especie con gran potencial de cultivo en el Golfo de México. Con este propósito se realizaron bioensayos de corto plazo de 1 día y crónicos de 21 días en juveniles ( $1.58 \pm 0.03$  g peso húmedo). Las concentraciones subletales evaluadas fueron 0.2, 0.4 y 0.7 mg N-NH<sub>3</sub> l<sup>-1</sup> (1.9, 3.7 y 6.6 mg N-AT l<sup>-1</sup>, respectivamente); un grupo sin exposición al amonio se consideró como grupo testigo. Los bioensayos se realizaron a  $28 \pm 1$  °C,  $25 \pm 1$  ‰ de salinidad, pH  $8.2 \pm 0.1$  y  $5.4$  mg O<sub>2</sub> l<sup>-1</sup>. Al cabo de los 21 días de exposición, sólo en la condición de mayor concentración de amonio se obtuvo una mortalidad del 30%. El consumo de oxígeno de los camarones se alteró en exposiciones a corto plazo (10-24 h) por la exposición a 0.4 y 0.7 mg N-NH<sub>3</sub> l<sup>-1</sup>; sin embargo, en exposiciones crónicas (21 días) no se observó alteración en la tasa metabólica. La amplitud metabólica de los organismos se modificó por la acción del amonio independientemente del tiempo de exposición. La excreción del amonio de los camarones en exposiciones cortas, se mantuvo sin cambios; en contraste, la excreción se inhibió en los organismos expuestos de manera crónica a 0.2 mg N-NH<sub>3</sub> l<sup>-1</sup>. La presión osmótica de los camarones fue mayor en los expuestos 1 día en 0.4 mg N-NH<sub>3</sub> l<sup>-1</sup> y se mantuvo sin cambios a los 21 días de exposición. A pesar de que la contribución de los iones Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup> a la presión osmótica de la hemolinfa permanece constante, la concentración del Na<sup>+</sup> y del Cl<sup>-</sup> en la hemolinfa se modifica principalmente en 0.2 y 0.4 mg N-NH<sub>3</sub> l<sup>-1</sup>. La acumulación del amonio en la hemolinfa en los organismos expuestos por 1 día al amonio es mayor en 0.7 mg N-NH<sub>3</sub> l<sup>-1</sup>; sin embargo a los 21 días, la acumulación del tóxico se observa en concentraciones desde 0.2 mg N-NH<sub>3</sub> l<sup>-1</sup>; este comportamiento se relaciona con la alteración de la excreción de amonio obtenido durante el mismo periodo. Los niveles del amonio en el tejido branquial indican que éste funciona como primer órgano blanco de acumulación del amonio aún en exposiciones a corto plazo, mientras que el hepatopáncreas funciona como órgano de acumulación del amonio en los dos tiempos de exposición; en contraste, la acumulación del amonio en el músculo no se ve alterada por la exposición al contaminante. Los resultados obtenidos permiten afirmar que la urea no desempeña un papel central en la desintoxicación del amonio de los juveniles de *L. setiferus*. Así mismo, la actividad de la arginasa no indica claramente si la urea se forma por esta vía en el caso de que desempeñara un papel en la desintoxicación del amonio en estos organismos, por lo que se propone la realización de estudios que permitan determinar la posible intervención de la ruta uricolítica como el mecanismo de desintoxicación del amonio en *L. setiferus*.

## INTRODUCCIÓN

El camarón blanco *Litopenaeus setiferus* (Linnaeus, 1767) es una especie que presenta un gran potencial para su cultivo en el Golfo de México (Sandifer *et al.*, 1993). Dentro de los diferentes estadios del ciclo de vida de los camarones, la etapa juvenil es considerada como una de las más críticas durante el proceso de engorda y es la que además determina el éxito productivo del recurso. Al igual que para otros crustáceos, moluscos y peces, bajo condiciones de cultivo se presentan ciertas condiciones fisicoquímicas del agua que pueden alterar la integridad fisiológica de los organismos y por lo tanto limitar su producción. En este sentido, la acumulación del amonio determina su acción como contaminante en los ambientes acuáticos (Russo, 1985) y es uno de los principales factores que limitan el cultivo de los camarones peneidos (Chen *et al.*, 1988)

En los ambientes acuáticos, el amonio está presente en dos formas químicas: una ionizada ( $\text{NH}_4^+$ ) y otra no ionizada, en estado gaseoso ( $\text{NH}_3$ ). La proporción de las dos moléculas varía de acuerdo con la temperatura, salinidad y sobre todo con el pH de la solución. El amoniaco ( $\text{NH}_3$ ) disminuye con el incremento de la salinidad y aumenta con el incremento de la temperatura y del pH (Whitfield, 1974; Bower y Bidwel, 1978). El amonio es la principal fuente de nitrógeno del fitoplancton y de las algas en ambientes acuáticos, así como de las bacterias *Nitrosomonas* en ambientes terrestres y acuáticos (Collins *et al.*, 1975 y Hargreaves, 1988); sin embargo en ciertas concentraciones, el amonio es considerado como un tóxico para los animales. La toxicidad de este compuesto depende de la sensibilidad de cada especie. En los ambientes acuáticos, usualmente la mayor proporción se encuentra como ión amonio. Sin embargo, en los animales acuáticos el amoniaco ( $\text{NH}_3$ ) se considera como el principal tóxico debido a su tamaño, a su carencia de carga iónica y a su naturaleza lipofílica que facilita su difusión a través de las membranas celulares y por lo tanto a través de la branquia (Wright, 1995). En contraste, el  $\text{NH}_4^+$  es lipofóbico y penetra en menor grado por las membranas celulares (Kormanik y Cameron, 1981; Jobling, 1994).

---

A pesar de la reclasificación del Género *Penaeus* (Perez-Farfante y Kensley, 1997) en el presente trabajo se utilizó el nombre centífico de las especies como aparecen en los trabajos citados



Diversos estudios demuestran que el incremento de las concentraciones de amonio en los sistemas de cultivo altera numerosas respuestas fisiológicas de los camarones. Alcaraz *et al.* (1999) establecen que el consumo de oxígeno de las postlarvas de *Litopenaeus setiferus* disminuye al exponerse en 0.4 y 0.7 mg N-NH<sub>3</sub> l<sup>-1</sup>. En juveniles de *L. setiferus* la tasa respiratoria se reduce en organismos expuestos durante 1 hora (h) en 0.7 mg N-NH<sub>3</sub> l<sup>-1</sup> (Robles, 1997). En los decápodos *Notostomus gibbosus* y *Cancer magister*, la exposición a 20 mmol l<sup>-1</sup> de N-Amonio total (N-AT; 0.36 g l<sup>-1</sup>) reduce la afinidad de la hemocianina por el oxígeno alterando de esta manera el metabolismo aerobio (Sanders *et al.*, 1992).

En concentraciones mayores de 10 mg N-AT l<sup>-1</sup> la excreción nitrogenada de *Penaeus chinensis* es alterada, debido a la inhibición en el funcionamiento de las ATP-asas branquiales con la consecuente acumulación de amonio en la hemolinfa (Chen y Nan, 1992). De manera similar en juveniles de *L. setiferus* la excreción de amonio se inhibe en organismos expuestos 1 h en 0.4 mg N-NH<sub>3</sub> l<sup>-1</sup> y en los expuestos 10 días (d) en 0.4 y 0.7 mg N-NH<sub>3</sub> l<sup>-1</sup> (Robles, 1997). Por otra parte, concentraciones elevadas de amonio deterioran los procesos involucrados en la osmoregulación provocando una disminución significativa en los electrolitos de la hemolinfa de *P. japonicus* (Chen y Cheng, 1993a; Lin *et al.*, 1993 y Chen y Chen, 1996).

El amonio a su vez puede alterar la tasa de muda y el crecimiento de los peneidos. Al respecto, Chen y Kou (1992) reportan que en juveniles de *P. japonicus* el crecimiento se reduce en un 35% y 55% en concentraciones externas de amonio de 0.35 y 0.7 mg N-NH<sub>3</sub> l<sup>-1</sup>, respectivamente. En postlarvas de *P. monodon* el crecimiento disminuye un 4.4 y 6.5% en 3 y 6 mg l<sup>-1</sup> de amonio (Noor-Hamid *et al.*, 1994), en tanto que en postlarvas y juveniles de *P. setiferus* el crecimiento relativo se reduce significativamente en un 97 y 50%, respectivamente al ser expuestas 5 d (postlarvas) y 10 d (juveniles) en 0.7 mg N-NH<sub>3</sub> l<sup>-1</sup> (Robles, 1997).

Dependiendo tanto de la concentración del amonio como del tiempo de exposición a éste, los organismos poseen mecanismos que permiten contrarrestar su acción tóxica. Al respecto, Chen y Cheng (1993b) reportan que a partir de 4.6 mg N-AT l<sup>-1</sup> en los subadultos de *P. monodon* se presentan mecanismos de desintoxicación al amonio al cambiar su patrón de excreción de amoniotélicos a ureotélicos. De esta manera, la formación y eliminación de urea se propone como un mecanismo que reduce el efecto tóxico del amonio acumulado en el medio interno de los peneidos. Sin embargo, no se conoce con exactitud cual es la ruta metabólica por la cual la urea se sintetiza en los crustáceos. De manera general, se propone que la síntesis de urea en los organismos ocurre por el ciclo de la urea, por la ruta uricolítica o por la hidrólisis de la arginina a través de la arginasa (Figura A, B y C de Anexo, respectivamente; Claybrook, 1983; Campbell,

1991). Claybrook (1983) indica que en crustáceos la urea se origina a través de dos rutas diferentes: la hidrólisis de la arginina y la degradación del ácido úrico a través de la ruta uricolítica, debido a que carecen de un ciclo de urea funcional. Se propone que *P. japonicus* y *P. monodon* son capaces de sintetizar urea a partir de la hidrólisis de arginina en ambientes elevados de amonio Chen y Chen, 1997; Chen y Chen, 2000). Así mismo, se propone que en juveniles de *P. monodon* la urea se sintetiza a partir de  $\text{CO}_2$  y de amonio al exponerse en concentraciones mayores de  $9.6 \text{ mg N-AT l}^{-1}$  (Chen y Cheng, 1993b).

Se han propuesto otros mecanismos de desintoxicación del amonio en organismos acuáticos. Spaargaren (1985) indica que en *Carcinus maenas* la formación del nitrato puede participar en la desintoxicación del amonio (citado en Chen y Chen, 1997). Por su parte Schmitt y Santos (1999) sugieren que los juveniles de *P. paulensis* al ser expuestos en concentraciones subletales de amonio, acumulan una gran cantidad de amonio en alguna región corporal o es transformado a otros compuestos nitrogenados a excepción de urea y urato. King *et al.*, (1985) señalan que la glutamina desempeña un papel importante en la desintoxicación y el transporte del amonio en *Carcinus maenas*, *Cancer irroratus* y *Cancer borealis*. Por su lado, Greenaway (1991; citado en Chen y Chen, 2000) propone que en crustáceos decápodos existen a su vez varias rutas involucradas en la desintoxicación del amonio cuando éste se acumula en niveles elevados en el interior de los organismos o cuando la excreción es inhibida; las rutas propuestas incluyen la síntesis de glutamina, de ácido glutámico, de alanina, de serina, de purinas y de urea. En este sentido, en *Cancer pagurus* la concentración del glutamato se incrementa durante la emersión, al ser incapaces de excretar amonio (Regnault, 1992).

Estudios previos señalan que la excreción de amonio en juveniles de *L. setiferus* al exponerse 1h en concentraciones desde  $0.4 \text{ mg N-NH}_3 \text{ l}^{-1}$  es negativa ( $-561.17 \text{ } \mu\text{g N-AT h}^{-1}\text{g}^{-1}\text{PH}$ ) lo que sugiere la incorporación de este compuesto hacia el medio interno de los camarones. Este comportamiento sugiere que estos organismos poseen mecanismos de desintoxicación del amonio (Robles, 1997). Por lo anterior, se destaca la importancia de realizar estudios que permitan determinar cuales son los mecanismos por los cuales los organismos de esta especie son capaces de eliminar este compuesto, así como conocer los probables efectos fisiológicos y/o las estrategias adaptativas ante el amonio como estresor ambiental.

## OBJETIVOS

### GENERAL

Determinar el efecto de concentraciones subletales de amonio a diferentes respuestas fisiológicas y bioquímicas en juveniles de *Litopenaeus setiferus*.

### PARTICULARES

1. Determinar el efecto del amonio sobre el consumo de oxígeno de los juveniles de *L. setiferus*.
2. Determinar si las concentraciones subletales de amonio modifican el patrón y la forma de excreción del nitrógeno.
3. Determinar el efecto del amonio en la regulación iónica y osmótica de los juveniles.
4. Evaluar la acumulación de amonio y de urea en la hemolinfa y en el tejido (branquia, hepatopáncreas y músculo) de los camarones.
5. Evaluar la actividad enzimática de la arginasa en condiciones subletales de amonio y relacionarla con el posible mecanismo de desintoxicación del amonio.

## MATERIALES Y METODOS

### 1. CAPTURA Y MANTENIMIENTO

Los juveniles de *L. setiferus* fueron capturados en la laguna de Términos de Cd. del Carmen, Camp., con una red de arrastre tipo "chango" y con tiempos de arrastre menores de 5 minutos para evitar un estrés excesivo de los animales. Durante la captura la salinidad varió de 4 a 10‰, el oxígeno disuelto se mantuvo a saturación y la temperatura osciló entre 20 y 25°C. Los camarones de 2 g de peso húmedo se transportaron al Laboratorio de Biología Marina Experimental en bolsas de polietileno con agua de la zona de captura. Los juveniles se colocaron en estanques de 500 l de capacidad y se mantuvieron durante dos días bajo las mismas condiciones fisicoquímicas del agua del lugar de la captura.

Los organismos se transportaron a la ciudad de México al laboratorio de Ecofisiología en bolsas de polietileno en un ambiente saturado de oxígeno y con una temperatura de 22 a 25 °C, para disminuir su metabolismo y asegurar una disminución del estrés. Una vez en la Ciudad de México los organismos se colocaron en acuarios de 200 l de capacidad aditados con filtro biológico, el cual mantuvo los niveles de amonio y de nitrito en valores cercanos a cero mg l<sup>-1</sup>. El agua de los acuarios se mantuvo a temperatura ambiente, el pH entre 8.2 y 8.3, la salinidad a 10 ‰, el oxígeno disuelto (OD) a saturación y el fotoperíodo en 12:12 h luz:oscuridad. Estas condiciones se mantuvieron

---

## OBJETIVOS

### GENERAL

Determinar el efecto de concentraciones subletales de amonio a diferentes respuestas fisiológicas y bioquímicas en juveniles de *Litopenaeus setiferus*.

### PARTICULARES

1. Determinar el efecto del amonio sobre el consumo de oxígeno de los juveniles de *L. setiferus*.
2. Determinar si las concentraciones subletales de amonio modifican el patrón y la forma de excreción del nitrógeno.
3. Determinar el efecto del amonio en la regulación iónica y osmótica de los juveniles.
4. Evaluar la acumulación de amonio y de urea en la hemolinfa y en el tejido (branquia, hepatopáncreas y músculo) de los camarones.
5. Evaluar la actividad enzimática de la arginasa en condiciones subletales de amonio y relacionarla con el posible mecanismo de desintoxicación del amonio.

## MATERIALES Y METODOS

### 1. CAPTURA Y MANTENIMIENTO

Los juveniles de *L. setiferus* fueron capturados en la laguna de Términos de Cd. del Carmen, Camp., con una red de arrastre tipo "chango" y con tiempos de arrastre menores de 5 minutos para evitar un estrés excesivo de los animales. Durante la captura la salinidad varió de 4 a 10‰, el oxígeno disuelto se mantuvo a saturación y la temperatura osciló entre 20 y 25°C. Los camarones de 2 g de peso húmedo se transportaron al Laboratorio de Biología Marina Experimental en bolsas de polietileno con agua de la zona de captura. Los juveniles se colocaron en estanques de 500 l de capacidad y se mantuvieron durante dos días bajo las mismas condiciones fisicoquímicas del agua del lugar de la captura.

Los organismos se transportaron a la ciudad de México al laboratorio de Ecofisiología en bolsas de polietileno en un ambiente saturado de oxígeno y con una temperatura de 22 a 25 °C, para disminuir su metabolismo y asegurar una disminución del estrés. Una vez en la Ciudad de México los organismos se colocaron en acuarios de 200 l de capacidad aditados con filtro biológico, el cual mantuvo los niveles de amonio y de nitrato en valores cercanos a cero mg l<sup>-1</sup>. El agua de los acuarios se mantuvo a temperatura ambiente, el pH entre 8.2 y 8.3, la salinidad a 10 ‰, el oxígeno disuelto (OD) a saturación y el fotoperíodo en 12 h luz/oscuridad. Estas condiciones se mantuvieron

durante tres días (d), para permitir la recuperación del estrés de los organismos originada por la manipulación y el transporte. Una vez transcurrido este tiempo se incrementó la temperatura y la salinidad 1°C/d y 2‰/d, hasta llegar a 28°C y 25‰, respectivamente. Los organismos se mantuvieron en estas condiciones 8 días antes de la exposición a las concentraciones subletales de amonio. Las mediciones de los parámetros fisicoquímicos del agua se evaluaron diariamente con un termómetro (Brannan  $\pm 0.5$  °C), un potenciómetro (Trans Instrument  $\pm 0.05$ ), un refractómetro (Atago  $\pm 0.5$  ‰) y un oxímetro (YSI 54A  $\pm 0.05$  mg O<sub>2</sub> l<sup>-1</sup>).

Durante el tiempo de mantenimiento los camarones se alimentaron tres veces al día con camaronina 35% de proteína (Purina S. A. de C. V.; Tabla A Anexo.) al 10 % de su peso corporal que son condiciones apropiadas para el requerimiento nutritivo de los juveniles (Gaxiola, 1994). Las horas de alimentación fueron a las 8, 14 y 20 hr.

## 2. PRUEBAS DE TOXICIDAD

Las concentraciones subletales de amonio utilizadas en el presente estudio se eligieron a partir de bioensayos previos de toxicidad crónica en postlarvas y juveniles tempranos de *L. setiferus* (Robles, 1997). Lo anterior permitió a su vez establecer comparaciones entre diferentes estadios de la especie para profundizar en la capacidad de respuesta de los organismos ante la acumulación ambiental del amonio. A su vez éstas concentraciones se determinaron a partir de bioensayos de toxicidad aguda y además son concentraciones que se presentan en sistemas de cultivo intensivo y semi-intensivo de camarones peneidos. En *P. penicillatus* las concentraciones de N-NH<sub>3</sub> en sistemas de cultivo llegan alcanzar valores de 0.16 hasta 0.87 mg l<sup>-1</sup> (Chen *et al.*, 1988). En México, en el cultivo semi-intensivo del camarón *L. stylirostris* se obtienen concentraciones de 0.03 a 0.8 mg N-NH<sub>3</sub> l<sup>-1</sup>, que dependen tanto del ciclo diurno como del anual (Franco, 1998).

Las concentraciones de amonio utilizadas fueron 0.2, 0.4 y 0.7 mg N-NH<sub>3</sub> l<sup>-1</sup>, correspondientes a 1.9, 3.7 y 6.6 mg amonio l<sup>-1</sup>; un grupo de organismos sin exposición al amonio se consideró como testigo. Las concentraciones experimentales de amonio no ionizado (NH<sub>3</sub>) se obtuvieron a partir de una solución madre de cloruro de amonio (NH<sub>4</sub>Cl, Baker, 99.7% pureza), considerando la salinidad, la temperatura y el pH del agua de los acuarios experimentales. Las concentraciones de N-amonio total (mg N-AT l<sup>-1</sup>) se determinaron a partir de la técnica colorimétrica azul de indofenol (Tabla 1; Rodier, 1981) de muestras de agua de los acuarios. Las concentraciones del N-amonio no ionizado mg N-NH<sub>3</sub> l<sup>-1</sup> se determinaron a partir de las ecuaciones de Bower y Ridwell (1978):

$$\%N- NH_3 = (100 / (1 + \text{antilog}(pK_T - pH)))$$

Tabla 1. Técnica colorimétrica Azul de Indofenol. Rodier, 1981.

REACTIVO	VOLUMEN
Muestra	2.5 ml
Sol. Fenol	100 $\mu$ l
Sol. Nitroprusiato	100 $\mu$ l
Sol. Oxidante	250 $\mu$ l
Mezclar y leer a 645nm	

Las exposiciones a las concentraciones subletales de amonio se establecieron de corto plazo (24 h o 1 d) y de largo plazo (21d). Para la exposición a 24 horas se colocaron 20 organismos en acuarios de 40 l por condición experimental y se mantuvieron sin alimento. Al final de las pruebas de toxicidad de corto y largo plazo, se sacrificaron los organismos y se obtuvo el peso húmedo (g PH) de los camarones en una balanza analítica (Sartorius;  $\pm 0.05$  mg).

Para determinar el efecto de la exposición crónica (21 d) al amonio en los juveniles de *L. setiferus* se realizaron bioensayos semiestáticos con recambio diario del 33% del volumen de agua de los acuarios durante el cual se retiraron las heces y el alimento remanente. Lo anterior impidió el incremento del amonio originado por la excreción misma de los organismos y por la amonificación de las heces y del alimento remanente, a su vez evitó un cambio en el pH del medio acuático que conllevaría a un cambio en la concentración del amoniaco. Así mismo, la concentración homogénea del amonio en cada dispositivo experimental se obtuvo a través de la aireación permanente que presentaba cada acuario. La aireación se mantuvo en un nivel mínimo necesario para evitar la difusión del  $NH_3$  hacia la atmósfera pero que a su vez fuera suficiente para mantener una concentración de oxígeno disuelto mayor a 4.0 mg l<sup>-1</sup> para evitar que los organismos estuvieran en condiciones de hipoxia.

En la exposición a largo plazo (21 d) los juveniles de *L. setiferus* (1.58  $\pm$  0.03, g PH) se colocaron al azar en acuarios de 40 l de capacidad y acondicionados con 12 divisiones de malla de polietileno cada uno. Para cada concentración de amonio se emplearon dos acuarios mantenidos en las mismas condiciones. Diez organismos por concentración de amonio se colocaron en cada una de las divisiones de los acuarios; en una de las divisiones se colocó el termostato que mantenía constante la temperatura (28°C) y en la restante se colocó la aireación. Los camarones se colocaron en los

acuarios 24 horas antes de la dosificación de las concentraciones de amonio, período en el cual permanecieron en ayuno (Molina *et al.*, 1997). En los ensayos crónicos, los organismos se alimentaron con camarónina una sola vez al día (35%; Purina S.A de C.V.; Tabla A Anexo) al 5% de su peso corporal únicamente una vez al día para evitar el estrés producido por el retiro diario del alimento remanente y de las heces producidas.

En los bioensayos de corto plazo (24 h) las evaluaciones de la concentración externa de amonio se realizaron inmediatamente después de la dosificación del contaminante. En los bioensayos crónicos estas determinaciones se realizaron 2 veces al día, antes y después del recambio del agua. Durante los experimentos los parámetros fisicoquímicos del agua (temperatura, salinidad, oxígeno disuelto y pH) se mantuvieron similares a los de la etapa de mantenimiento (Rosas *et al.*, 1999).

Para determinar el efecto tóxico de la exposición a corto y largo plazo de concentraciones subletales de amonio, se evaluó el consumo de oxígeno, la excreción de amonio y de urea. También se determinó la acumulación de amonio, de urea y de los iones  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Cl}^-$  en la hemolinfa. Así mismo, se determinó la acumulación del amonio y de la urea y la actividad enzimática de la arginasa en las branquias, el hepatopáncreas y el músculo de los organismos. Todos los camarones analizados se encontraban en etapa de intermuda por ser una condición en donde no se presentan los cambios fisiológicos y bioquímicos originados por el cambio de la muda (Skinner, 1985).

### 3. RESPUESTAS FISIOLÓGICAS

#### a) Consumo de oxígeno

La tasa respiratoria ( $\text{mg O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g PH}^{-1}$ ) se evaluó a través del consumo de oxígeno en ciclos de 24 horas. Se utilizó un sistema de flujo semicontinuo y termorregulado (Fig.1) que constaba de 11 cámaras respirométricas de vidrio de 430 ml de capacidad.

Para evaluar el efecto del amonio a corto plazo (24 h), para cada condición experimental se emplearon 10 juveniles provenientes de los acuarios de 40 l y se colocaron de manera individual en las cámaras respirométricas con agua con características fisicoquímicas semejantes a las establecidas durante el mantenimiento. Una cámara sin organismo se consideró como testigo. Los organismos permanecieron en dichas cámaras durante 3 horas con flujo continuo previo a la adición del amonio ( $20 \text{ ml min}^{-1}$ ) con el fin de disminuir el estrés ocasionado por la manipulación (Molina, *et al.*, 1997). Una vez transcurrido este tiempo se adiciona en los reservorios el volumen de solución

madre de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  requerido para la obtención en cada caso, de las diferentes concentraciones experimentales de amoníaco y se procedió al recambio del agua de las cámaras respirométricas, manteniendo un flujo continuo durante 1 hora para asegurar el recambio total del agua dentro de estas (Cech, 1990).

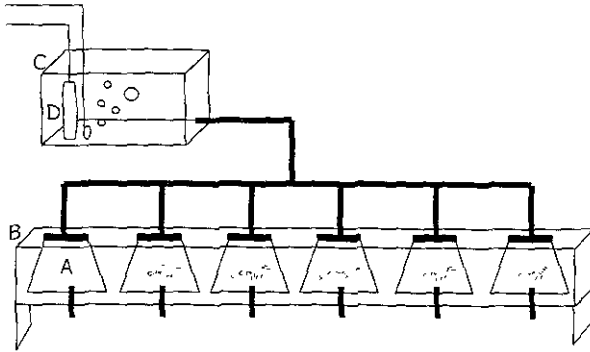


Figura 1. Sistemas respirométrico de flujo semicontinuo. A: cámaras respirométricas; B: baño termostregulado; C: Reservorio, D: Termostato

La tasa respiratoria de los organismos expuestos 21 d en amoníaco se evaluó de la manera antes descrita a diferencia que durante las 3 horas de aclimatación a las cámaras respirométricas las concentraciones de amoníaco fueron similares a las de cada condición experimental.

En ambos períodos de exposición (corto y largo plazo), después del tiempo de aclimatación a las cámaras respirométricas se midió la concentración de oxígeno en muestras de agua de cada cámara ( $\text{O}_2$ )<sub>i</sub> e inmediatamente se suspendió el flujo de agua. El tiempo de cerrado de las cámaras varió de 45 min a 1 hora, después del cual se midió la concentración de oxígeno en muestras de agua de cada cámara ( $\text{O}_2$ )<sub>f</sub> y se restableció el flujo de agua durante 1.5 h. Este procedimiento se repitió cada tres horas durante 24 h. En todos los bioensayos las evaluaciones se iniciaron aproximadamente a las 13:30 hrs y terminaron a la misma hora del día siguiente.

La tasa respiratoria individual ( $\text{mg O}_2 \text{ h}^{-1}$ ) se determinó a partir de la diferencia entre las concentraciones del oxígeno disuelto inicial  $[\text{O}_2]_i$  y final  $[\text{O}_2]_f$ , considerando el volumen de las cámaras (V, l) y el tiempo de cerrado (t, h) de las mismas (Cech, 1990):

$$VO_2 = (([\text{O}_2]_i - [\text{O}_2]_f) V) / t$$



Los resultados se corrigieron por los valores obtenidos en la cámara testigo, sin organismo. El consumo de oxígeno se relacionó con el peso de los organismos ( $\text{g PH}$ ) y se expresó en  $\text{mg O}_2\text{h}^{-1}\text{g}^{-1}\text{PH}$ .

### b) Excreción nitrogenada.

La tasa de excreción de amonio y de urea de los juveniles se realizó a corto (24 h) y largo plazo (21 d) y se evaluó en los mismos organismos y en el mismo sistema descrito para la evaluación de la tasa respiratoria, pero utilizando muestras de agua independientes. La cuantificación del nitrógeno de amonio se efectuó en muestras de 2.5 ml y se consideró una dilución de 5 veces para el caso de 0.2 y 0.4  $\text{mg N-NH}_3 \text{ l}^{-1}$  y de 10 veces para 0.7  $\text{mg N-NH}_3 \text{ l}^{-1}$ ; en las muestras de agua del grupo testigo no se efectuaron diluciones. Para la determinación de la excreción de urea se utilizaron muestras de 100  $\mu\text{l}$  y no se realizaron diluciones en ninguno de los diferentes tratamientos.

La concentración del nitrógeno de amonio ( $\text{mg N-AT l}^{-1}$ ) en las muestras iniciales y finales de agua se determinaron por la técnica azul de indofenol (Rodier, 1981; Tabla 1). Las concentraciones de urea se obtuvieron mediante el método enzimático-colorimétrico de diagnóstico clínico de Urea (No.124770, Lakeside Co.). El método permite determinar la cantidad de amonio producido a partir de la degradación de urea por parte de la ureasa y la cantidad de amonio existente *per se* en la muestra para lo cual una misma muestra se analizó con (Cu) y sin (Su) adición de la enzima (Tabla 2). Las absorbancias de las muestras se obtuvieron en un espectrofotómetro (Spectro 22, Labomed, Inc.) a 645nm.

Tabla 2. Técnica enzimática-colorimétrica de Urea.

REACTIVO	VOLUMEN, $\mu\text{l}$	
	Cu	Su
Ureasa	10 $\mu\text{l}$	-
Muestra	100 $\mu\text{l}$	100 $\mu\text{l}$
Incubar 10 min a 37°C		
Sol. de Fenol	2.5 ml	2.5 ml
Sol. de Hipoclorito	2.5 ml	2.5 ml
Incubar 15 min. a 37°C		
Leer a 645 nm		

El nitrógeno de amonio excretado por cada camarón se determinó a partir de la diferencia entre la concentración de las muestras finales  $[N-AT]_f$  e iniciales  $[N-AT]_i$  de agua considerando el tiempo de cerrado de las cámaras ( $t$ , h) y el volumen ( $V$ , l) de las mismas:

$$N-AT = (([N-AT]_f - [N-AT]_i) V) / t$$

Considerando que la excreción nitrogenada de los organismos ocurre de manera puntual y que no es continua, los valores obtenidos a lo largo de cada ciclo de 24 h de las diferentes concentraciones externa de amonio se promediaron.

De manera similar, la excreción de urea de los organismos se calculó a partir de la diferencia entre la concentración de las muestras finales  $[Urea]_f$  e iniciales  $[Urea]_i$  de agua (con y sin adición de ureasa) considerando el tiempo de cerrado de las cámaras ( $t$ , h) y el volumen ( $V$ , l) de las mismas:

$$Urea = (([Urea]_f - [Urea]_i) V) / t$$

Los valores de la excreción de amonio y de urea se corrigieron por los obtenidos en la cámara testigo sin organismo, se relacionaron con el peso de los organismos (g, PH) y se expresaron en  $\mu\text{g N-NH}_4^+ \text{ h}^{-1} \text{ g PH}^{-1}$  para amonio y en  $\text{mg Urea h}^{-1} \text{ g PH}^{-1}$  para urea. Las determinaciones de la excreción de amonio y de urea se hicieron cada 3 y 6 horas durante 24 horas, respectivamente.

### c) Acumulación de amonio y urea en hemolinfa.

La evaluación de amonio y urea en la hemolinfa de los camarones se determinó en juveniles expuestos 24 h y 21 d en 0, 0.2, 0.4 y 0.7  $\text{mg N-NH}_3 \text{ l}^{-1}$ . En cada caso se utilizaron de 6 a 8 organismos. La hemolinfa se obtuvo del seno infra-branquial empleando jeringas para insulina de 1ml impregnada en sus paredes con heparina sódica ( $200 \text{ U ml}^{-1}$ ). La hemolinfa se diluyó con agua desionizada 10 y 4 veces para las determinaciones de amonio y urea, respectivamente. Todo el trabajo se hizo en frío.

La determinación de las concentraciones de amonio se realizó en muestras de 500  $\mu\text{l}$  empleando la técnica de azul de indofenol (Rodier, 1981; Tabla 1). La determinación de la concentración de urea se hizo con muestras de 50  $\mu\text{l}$  a través del método enzimático-colorimétrico del kit de urea (No.124770, Lakoside; Tabla 2). Para determinar la diferencia entre la cantidad de amonio formado a partir de la degradación de la urea y la cantidad de amonio presente *per se* en la hemolinfa, se

hicieron evaluaciones con ureasa (Cu) y sin ureasa (Su), la diferencia obtenida de esta manera se consideró como la cantidad de urea acumulada (mg Urea l<sup>-1</sup>): 0

$$\text{mg Urea l}^{-1} = (\text{mg Urea l}^{-1} \text{ (Cu)} - \text{mg Urea l}^{-1} \text{ (Su)})$$

Los valores de amonio y urea obtenidos se corrigieron por el factor de dilución considerado en cada caso. Al término de la extracción de la hemolinfa, los organismos se enjuagaron con agua desionizada, se secaron con papel absorbente y se pesaron en una balanza analítica (Sartorius; ± 0.05 mg).

#### **d) Acumulación de amonio y urea en tejido.**

Para la evaluación de amonio y urea en el tejido, los organismos se enjuagaron con agua desionizada, se secaron y se pesaron en una balanza analítica (Sartorius; ± 0.05 mg). En el caso de las branquias únicamente se disectaron los filamentos branquiales con la ayuda de tijeras de punta fina; el hepatopáncreas se disectó completamente eliminando el segmento digestivo que se encuentra dentro de él; para el músculo se obtuvo únicamente la porción perteneciente a la primera somita del abdomen. Los tejidos disectados se enjuagaron con agua desionizada, se pesaron y se homogeneizaron durante un minuto con agua desionizada en una proporción de 0.1g ml<sup>-1</sup>. El homogenado se centrifugó a 10 000 rpm durante 30 min. a 4°C (Microcentrifuga Eppendorf 4515 C, Hamburg Germany). Posteriormente, el sobrenadante obtenido se diluyó 8 veces con agua desionizada. Todo el trabajo antes mencionado se realizó a 4°C.

Los niveles de amonio se evaluaron en muestras de 500 µl del sobrenadante a través de técnica azul de indofenol (Rodier, 1981). La urea se evaluó en muestras de 100 µl. Para el cálculo de la concentración de amonio y urea se consideró la dilución efectuada y se siguieron los mismos procedimientos descritos para su cuantificación en la hemolinfa.

#### **e) Concentración iónica y osmótica en hemolinfa.**

La presión osmótica y la concentración del Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup> de la hemolinfa de los juveniles de *L. setiferus* se evaluó en las mismas muestras de hemolinfa obtenida para cuantificar la acumulación de amonio y se utilizó de igual manera una dilución de 10 veces. La presión osmótica se determinó con un micro-osmómetro (The Advanced, Mod. 3300; ± 0.5 mOsm Kg<sup>-1</sup>); los valores se corrigieron por el factor de dilución correspondiente y se expresaron en mOsm kg<sup>-1</sup>. Las concentraciones de

$\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Cl}^-$  se determinaron en un multianalizador de iones (Easylyte Plus;  $\pm 0.05 \text{ Na}^+$ ,  $0.005 \text{ K}^+$  y  $0.05 \text{ Cl}^-$ ), se corrigieron por el factor de dilución correspondiente y se expresaron en  $\text{mmol l}^{-1}$ .

#### f) Actividad de la arginasa

La actividad de la arginasa se determinó a partir de la técnica de Hanlon (1975) y se utilizaron las mismas muestras de tejido empleadas para la evaluación de amonio y urea. La técnica consiste en la determinación de la actividad de la arginasa a través de la cuantificación de ornitina formada. Una vez obtenido el homogenado de los tejidos se tomó una muestra de 100  $\mu\text{l}$  y se colocaron los reactivos en la secuencia señalada en la tabla 3. Para cada una de las muestras de tejido se realizó su respectivo blanco que consistía en adicionar ácido acético desde un inicio de la reacción para inhibir la actividad de la arginasa por el cambio de pH y conocer de esta manera la intensidad de la reacción que no es originada por la enzima arginasa. Los resultados se corrigieron por el tiempo que duró la reacción (60 min) y por gramo de tejido. Los resultados se reportaron en  $\text{mmol Ornitina min}^{-1} \text{ g}^{-1}$  tejido.

Tabla 3. Técnica para la determinación de la actividad de la arginasa de branquia, hepatopáncreas y músculo de juveniles de *L. setiferus* expuestos en concentraciones subletales de amonio. Modificada de Hanlon (1975).

REACTIVO	MUESTRA EXPERIMENTAL	MUESTRA BLANCO
Acido acético $\mu\text{l}$	—	100
Homogenado $\mu\text{l}$	100	100
MnSO <sub>4</sub> $\mu\text{l}$	12.5	12.5
L-Arginina $\mu\text{l}$	37.5	37.5
Mezclar e incubar a 37 °C durante 60 min.		
Acido acético $\mu\text{l}$	100	—
Centrifugar 12 000 rpm, 10 min.		
Sobrenadante $\mu\text{l}$	125	125
Ninhidrina $\mu\text{l}$	125	125
Agua destilada $\mu\text{l}$	250	250
Baño María a ebullición durante 12 min y enfriar a temperatura ambiente		
Ac. acético ml	1.25	1.25
Incubar a 85 °C y enfriar a T ambiente. Leer a 525 nm		

#### 4. ANALISIS ESTADISTICO

Para determinar el efecto significativo de las concentraciones de amonio sobre las diferentes respuestas bioquímicas y fisiológicas evaluadas se utilizó el análisis de varianza paramétrico (ANOVA). Las diferencias significativas ( $P < 0.05$ ), tanto por efecto del tiempo de exposición como de la concentración de  $N-NH_3$ , se determinaron a través de la prueba paramétrica de comparación múltiple de Newman-Keuls (Zar, 1984).

## RESULTADOS

En los juveniles de *Litopenaeus setiferus* del grupo testigo se obtuvo una sobrevivencia del 100%, al igual que en los grupos expuestos a 0.2 y 0.4 mg N-NH<sub>3</sub> l<sup>-1</sup> 21 d. Sin embargo, en los organismos expuestos a 0.7 mg N-NH<sub>3</sub> l<sup>-1</sup> la sobrevivencia fue del 70% al término de los 21 días de exposición al contaminante.

### 1. Consumo de Oxígeno.

En los camarones expuestos 24h al amonio, la tasa respiratoria (mg O<sub>2</sub> h<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup> PH) de los organismos del grupo testigo presentó un ritmo circádico bimodal con valores máximos en horas de la madrugada (0.49 mg O<sub>2</sub> h<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup> PH) y mínimos en la mañana (0.23 mg O<sub>2</sub> h<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup> PH). De igual forma, el consumo de oxígeno de los organismos expuestos a 0.2, 0.4 y 0.7 mg N-NH<sub>3</sub> l<sup>-1</sup> presentaron la mayor y menor tasa metabólica en horas similares al grupo testigo. En 0.2 mg N-NH<sub>3</sub> l<sup>-1</sup>, los camarones mantuvieron un ritmo circádico bimodal; sin embargo, al aumentar el amonio externo (0.4 y 0.7 mg N-NH<sub>3</sub> l<sup>-1</sup>) el comportamiento respiratorio fue unimodal. La tasa respiratoria de los organismos expuestos a 0.2 y 0.4 mg N-NH<sub>3</sub> l<sup>-1</sup> fue similar al inicio y al final del ciclo de 24 horas ( $P > 0.05$ ). En contraste, en los camarones expuestos a 0.7 mg N-NH<sub>3</sub> l<sup>-1</sup> el consumo de oxígeno se incrementó a las 25 h 55% respecto a la primera hora de exposición ( $P < 0.05$ ; Tabla 2; Fig. 2).

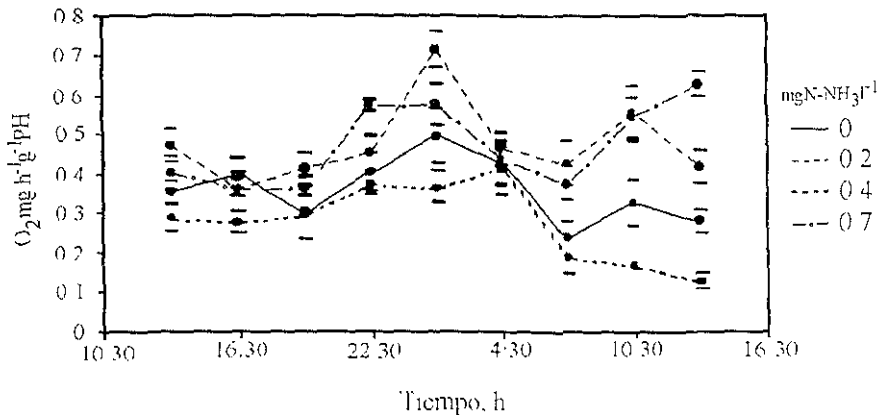


Figura 2. Consumo de oxígeno en un ciclo de 24 h de juveniles de *L. setiferus* expuestos en concentraciones subletales de amonio. Se indica  $\bar{X} \pm ES$

Al final de la exposición de 24 h a 0.2 y 0.7 mg N-NH<sub>3</sub> l<sup>-1</sup> los peneídos presentaron un incremento significativo en la tasa metabólica, mientras que los expuestos a 0.4 mg N-NH<sub>3</sub> l<sup>-1</sup> ésta se redujo. (Fig. 3).

Tabla 2. Consumo de oxígeno (mg O<sub>2</sub> h<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup> PH;  $\bar{X} \pm ES$ , n=10) de juveniles de *Litopenaeus setiferus* expuestos durante 24 h en diferentes concentraciones subletales de amonio.

Tiempo de exp. h	Hora	N-NH <sub>3</sub> mg L <sup>-1</sup>			
		0	0.2	0.4	0.7
1	13:30	0.35 ± 0.03 <sup>ab12</sup>	0.47 ± 0.04 <sup>a1</sup>	0.28 ± 0.03 <sup>ab2</sup>	0.40 ± 0.04 <sup>ab12</sup>
4	16:30	0.39 ± 0.05 <sup>ab1</sup>	0.36 ± 0.04 <sup>a1</sup>	0.27 ± 0.03 <sup>ab1</sup>	0.36 ± 0.03 <sup>a1</sup>
7	19:30	0.33 ± 0.06 <sup>ab1</sup>	0.41 ± 0.04 <sup>a1</sup>	0.29 ± 0.05 <sup>ab1</sup>	0.36 ± 0.03 <sup>a1</sup>
10	22:30	0.40 ± 0.05 <sup>ab1</sup>	0.45 ± 0.04 <sup>a12</sup>	0.37 ± 0.03 <sup>a1</sup>	0.57 ± 0.02 <sup>cd2</sup>
13	1:30	0.49 ± 0.07 <sup>a12</sup>	0.71 ± 0.04 <sup>b3</sup>	0.36 ± 0.04 <sup>a1</sup>	0.57 ± 0.05 <sup>cd23</sup>
16	4:30	0.44 ± 0.05 <sup>ab1</sup>	0.46 ± 0.04 <sup>a1</sup>	0.41 ± 0.07 <sup>a1</sup>	0.43 ± 0.03 <sup>abc1</sup>
19	7:30	0.23 ± 0.04 <sup>b1</sup>	0.42 ± 0.05 <sup>a2</sup>	0.18 ± 0.04 <sup>b1</sup>	0.37 ± 0.04 <sup>a2</sup>
22	10:30	0.32 ± 0.06 <sup>ab1</sup>	0.55 ± 0.07 <sup>a2</sup>	0.16 ± 0.03 <sup>b1</sup>	0.54 ± 0.05 <sup>bcd2</sup>
25	13:30	0.27 ± 0.03 <sup>ab1</sup>	0.41 ± 0.04 <sup>a2</sup>	0.12 ± 0.02 <sup>b3</sup>	0.62 ± 0.03 <sup>d4</sup>

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

Números diferentes en una misma fila denotan diferencias significativas (P<0.05)

La amplitud metabólica del grupo testigo fue de 0.25 mg O<sub>2</sub> h<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup> PH y se mantuvo sin cambios en los organismos mantenidos en las diferentes concentraciones de amonio, a pesar de que en 0.2 y 0.4 mg N-NH<sub>3</sub> l<sup>-1</sup>, la amplitud metabólica respecto al grupo testigo fue 34 y 12% mayor, respectivamente (P>0.05; Fig. 4).

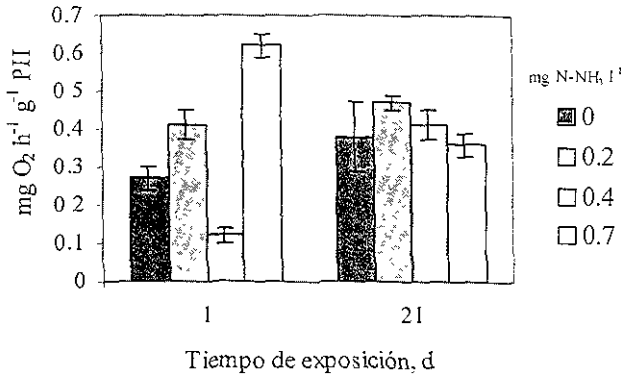


Figura 3. Consumo de oxígeno de juveniles de *L. setiferus* expuestos 1 y 21 d en amonio. Se grafican valores  $\bar{X} \pm \text{ES}$ .

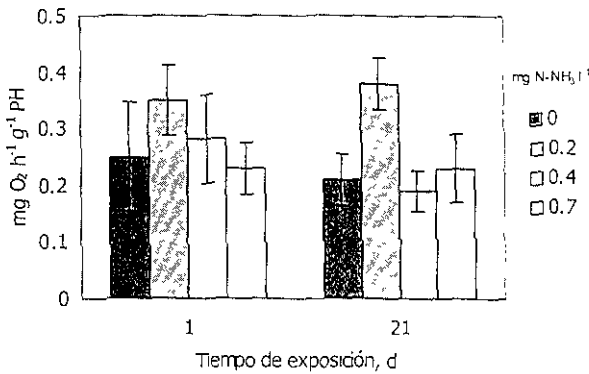


Figura 4. Amplitud metabólica de juveniles de *L. setiferus* expuestos 1 y 21 d en amonio. Se grafican valores  $\bar{X} \pm \text{ES}$ .

Después de 21 días, el consumo de oxígeno de los camarones del grupo testigo presentó un comportamiento bimodal, con la mayor tasa metabólica a las 22:30 h. En los camarones expuestos a 0.2 y 0.7  $\text{mg N-NH}_3 \text{ l}^{-1}$  presentó un comportamiento bimodal similar al grupo testigo. En contraste, a 0.4  $\text{mg N-NH}_3 \text{ l}^{-1}$  el ritmo circádico fue unimodal (Tabla 3; Fig 5). Al final de la exposición de 24 h a 0.2 y 0.7  $\text{mg N-NH}_3 \text{ l}^{-1}$  los peneidos presentaron un incremento significativo en la tasa metabólica, mientras que los expuestos en 0.4  $\text{mg N-NH}_3 \text{ l}^{-1}$  esta se redujo. (Fig. 3)



El consumo de oxígeno de los juveniles expuestos de manera crónica al amonio (21 días) presentó los mayores valores en el período nocturno, de manera similar al grupo testigo ( $P > 0.05$ ), excepto en  $0.2 \text{ mg N-NH}_3 \text{ l}^{-1}$  donde la mayor actividad fue en horas de la mañana (10:30 h) con un incremento del 56% respecto a la máxima tasa metabólica del grupo testigo ( $P < 0.05$ ). En las diferentes condiciones experimentales el consumo de oxígeno de la última medición del ciclo de 24 horas regresó a los valores iniciales (Tabla 3; Fig. 5).

Tabla 3. Consumo de oxígeno en un ciclo de 24 h ( $\text{mgO}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ PH}$ ;  $\bar{X} \pm \text{ES}$ ,  $n=10$ ) de juveniles de *Litopenaeus setiferus* expuestos 21 d en concentraciones subletales de amonio.

Tiempo de exp. h	Hora	N-NH <sub>3</sub> mg L <sup>-1</sup>			
		0	0.2	0.4	0.7
1	13:30	$0.32 \pm 0.01^{a1}$	$0.39 \pm 0.03^{a1}$	$0.51 \pm 0.04^{a2}$	$0.40 \pm 0.03^{ab1}$
4	16:30	$0.43 \pm 0.04^{a1}$	$0.38 \pm 0.02^{b1}$	$0.45 \pm 0.04^{a1}$	$0.35 \pm 0.03^{ab1}$
7	19:30	$0.31 \pm 0.04^{a1}$	$0.46 \pm 0.02^{ab2}$	$0.33 \pm 0.02^{a1}$	$0.40 \pm 0.03^{ab12}$
10	22:30	$0.48 \pm 0.01^{a1}$	$0.46 \pm 0.05^{ad1}$	$0.48 \pm 0.04^{a1}$	$0.47 \pm 0.07^{ab1}$
13	1:30	$0.42 \pm 0.06^{a1}$	$0.60 \pm 0.03^{b2}$	$0.42 \pm 0.05^{a1}$	$0.30 \pm 0.04^{a1}$
16	4:30	$0.43 \pm 0.05^{a1}$	$0.56 \pm 0.03^{bd2}$	$0.43 \pm 0.04^{a1}$	$0.41 \pm 0.03^{ab1}$
19	7:30	$0.38 \pm 0.08^{a1}$	$0.54 \pm 0.05^{bd1}$	$0.37 \pm 0.06^{a1}$	$0.50 \pm 0.06^{b1}$
22	10:30	$0.27 \pm 0.03^{a1}$	$0.75 \pm 0.05^{c2}$	$0.34 \pm 0.02^{a13}$	$0.43 \pm 0.03^{ab3}$
24	13:30	$0.38 \pm 0.09^{a1}$	$0.47 \pm 0.02^{ad1}$	$0.41 \pm 0.04^{a1}$	$0.36 \pm 0.03^{ab1}$

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

Números diferentes en una misma fila denotan diferencias significativas ( $P < 0.05$ ).

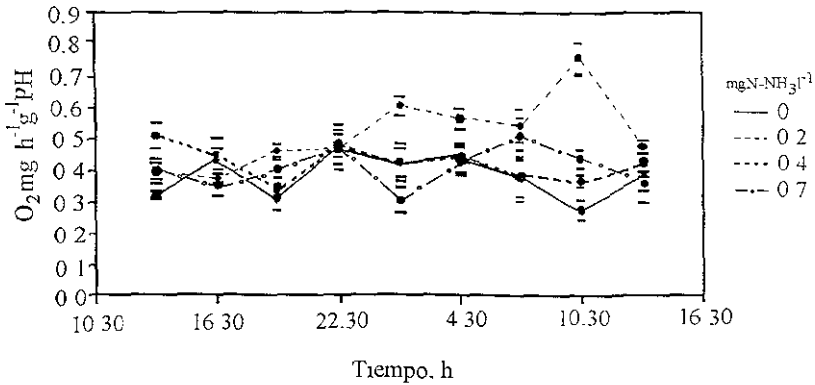


Figura 5. Consumo de oxígeno en un ciclo de 24 h de juveniles de *L. setiferus* expuestos 21 d en concentraciones subletales de amonio. Se indica  $\bar{X} \pm ES$ .

La amplitud metabólica de los juveniles expuestos a 0.2 mg N-NH<sub>3</sub> l<sup>-1</sup> (0.38 mg O<sub>2</sub> h<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup> PH) fue 81% mayor que la obtenida en el grupo testigo ( $P < 0.05$ ). Sin embargo, en los organismos expuestos a 0.4 y 0.7 mg N-NH<sub>3</sub> l<sup>-1</sup> la amplitud metabólica no se modificó respecto al grupo testigo (Fig. 4).

## 2. Excreción Nitrogenada.

La excreción de amonio ( $\mu\text{g N-NH}_4 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ PH}$ ) de los organismos expuestos 24 h a las diferentes concentraciones de amonio no presentó diferencias significativas respecto al grupo testigo ( $P > 0.05$ ), si bien se obtuvieron incrementos del 155, 116 y 93% en 0.2, 0.4 y 0.7 mg N-NH<sub>3</sub> l<sup>-1</sup>, respectivamente ( $P > 0.05$ ; Tabla 4, Fig. 6).

La excreción nitrogenada de los organismos del grupo testigo fue similar en los dos tiempos de evaluación (24 h y 21 d) con valores de 19.07 y de 21.13  $\mu\text{g N-NH}_4 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ PH}$ , respectivamente ( $P > 0.05$ ). En los organismos expuestos 21 d a las diferentes condiciones experimentales, la excreción de amonio presentó valores negativos en los grupos mantenidos a 0.2 y 0.4 mg N-NH<sub>3</sub> l<sup>-1</sup>, la disminución de la tasa, respecto al grupo testigo fue de 136 y 103%, respectivamente. En contraste, en 0.7 mg N-NH<sub>3</sub> l<sup>-1</sup> los juveniles incrementaron su excreción 72% respecto al grupo testigo ( $P > 0.05$ , Tabla 4, Fig. 6).

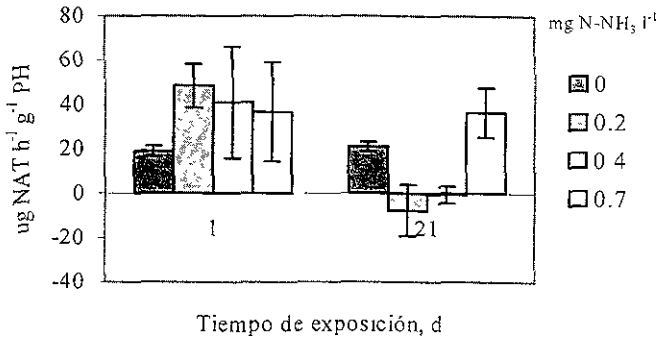


Figura 6. Excreción de amonio de juveniles de *Litopenaeus setiferus* expuestos a corto y a largo plazo en concentraciones subletales de amonio. Se grafican valores  $\bar{X} \pm ES$ .

Tabla 4. Excreción de amonio ( $\mu\text{g N-AT h}^{-1} \text{g}^{-1} \text{PH}$ ;  $\bar{X} \pm ES$ ) de juveniles de *Litopenaeus setiferus* expuestos en concentraciones subletales de amonio.

NAT mg l <sup>-1</sup>	N-NH <sub>3</sub> mg l <sup>-1</sup>	Tiempo de exposición, d	
		1	21
0	0	19.01 ± 2.39 <sup>a1</sup>	21.13 ± 2.13 <sup>bc1</sup>
1.9	0.2	48.56 ± 9.81 <sup>a1</sup>	-7.69 ± 11.49 <sup>a2</sup>
3.7	0.4	41.16 ± 25.23 <sup>a1</sup>	-0.59 ± 3.83 <sup>ab1</sup>
6.6	0.7	36.80 ± 22.28 <sup>a1</sup>	36.34 ± 11.18 <sup>c1</sup>

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

El efecto del tiempo sobre la excreción de amonio de los organismos expuestos en 0.4 y en 0.7 mg N-NH<sub>3</sub> l<sup>-1</sup> no fue significativo a pesar de que en 0.4 mg N-NH<sub>3</sub> l<sup>-1</sup> la excreción de amonio a los 21 d de exposición fue 101% menor que al primer día. En contraste, en 0.2 mg N-NH<sub>3</sub> l<sup>-1</sup> la excreción a los 21 d fue menor 116% que en el primer día de la evaluación ( $P < 0.05$ ; Tabla 4).

Cabe señalar que debido a errores metodológicos no se pudo determinar la excreción de urea de los juveniles debido a que los resultados no mostraron ninguna relación lógica entre las diferentes concentraciones de amonio. La probable razón de este resultado es que el amonio impidió la degradación de la urea debido a que es un inhibidor de la ureasa, enzima utilizada en la técnica que sintetiza amonio a partir de la degradación de urea.

### 3. Medio Interno.

#### a) Concentración de amonio y urea.

Los niveles de **amonio** ( $\text{mg NAT l}^{-1}$ ) en la hemolinfa de los organismos del grupo testigo fueron similares en los dos tiempos de evaluación ( $7.1 \text{ mg NAT l}^{-1}$ ). En el primer día de exposición al tóxico, la concentración del amonio en el medio interno de los organismos expuestos en  $0.2$  y  $0.4 \text{ mg N-NH}_3 \text{ l}^{-1}$  no presentó diferencias significativas respecto al grupo testigo, a pesar de que se observa una ligera tendencia a incrementarse la concentración externa de amonio ( $P > 0.05$ ). Sin embargo, en los camarones mantenidos en  $0.7 \text{ mg N-NH}_3 \text{ l}^{-1}$ , el amonio en el medio interno fue 37% mayor que en el grupo testigo ( $P < 0.05$ ) y 13 y 18% que en los expuestos en  $0.2$  y  $0.4 \text{ mg N-NH}_3 \text{ l}^{-1}$ , respectivamente ( $P > 0.05$ ; Tabla 5, Fig. 7).

Tabla 5. Amonio ( $\text{NAT, mg l}^{-1}$ ;  $\bar{X} \pm \text{ES}$ ) en hemolinfa de juveniles de *L. setiferus* expuestos 1 y 21 d en concentraciones subletales de amonio.

NAT $\text{mg l}^{-1}$	N-NH <sub>3</sub> $\text{mg l}^{-1}$	Tiempo de exposición, d	
		1	21
0	0	$7.1 \pm 0.3^{\text{a1}}$	$7.1 \pm 0.3^{\text{a1}}$
1.9	0.2	$8.0 \pm 0.8^{\text{a1}}$	$9.2 \pm 0.4^{\text{b1}}$
3.7	0.4	$8.4 \pm 0.8^{\text{a1}}$	$13.1 \pm 0.4^{\text{c2}}$
6.6	0.7	$9.7 \pm 0.5^{\text{b1}}$	$12.7 \pm 0.8^{\text{c2}}$

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

Números diferentes en una misma fila denotan diferencias significativas ( $P < 0.05$ ).

No se observó un efecto a lo largo del tiempo, en la acumulación del amonio en la hemolinfa en los organismos de  $0.2 \text{ mg N-NH}_3 \text{ l}^{-1}$ , a pesar de que a los 21d de exposición se observó un incremento de 15% respecto al primer día de exposición. En  $0.4$  y  $0.7 \text{ mg N-NH}_3 \text{ l}^{-1}$  se observó un incremento significativo de 56 y 31% a los 21d de exposición, respecto al primer día ( $P < 0.05$ ; Tabla 5).

A los 21d de exposición al amonio la acumulación de este compuesto se incrementó significativamente al incrementarse la concentración del tóxico. El incremento respecto al grupo testigo, fue de 30, 85 y 79 % en  $0.2$ ,  $0.4$  y  $0.7 \text{ mg N-NH}_3 \text{ l}^{-1}$ , respectivamente ( $P < 0.05$ ; Tabla 5, Fig. 7).

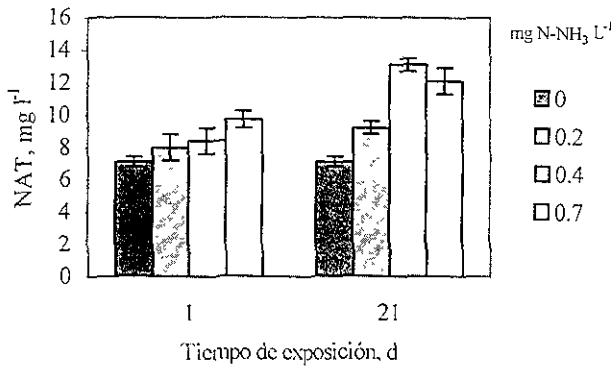


Figura 7. Amonio en hemolinfa de juveniles de *L. setiferus* expuestos 1 y 21 d en concentraciones subletales de amonio. Se grafican valores  $\bar{X} \pm \text{ES}$ .

El incremento en la concentración del amonio en los camarones expuestos 1 y 21 d en niveles subletales de amonio, respecto a los niveles base del amonio en la hemolinfa del grupo testigo, se visualiza en la figura 8. Al primer día de exposición al amonio, la concentración de este compuesto en la hemolinfa de los camarones es menor que los niveles del medio externo. Sin embargo, a los 21 d de exposición, el incremento en la concentración de amonio en la hemolinfa de los camarones expuestos a  $0.2$  y  $0.4 \text{ mg N-NH}_3 \text{ l}^{-1}$  ( $1.9$  y  $3.7 \text{ mg NAT l}^{-1}$ ) es mayor que el aumento en los niveles de amonio total del medio externo. En contraste, en  $0.7 \text{ mg N-NH}_3 \text{ l}^{-1}$  el aumento en los niveles internos de amonio de los camarones es menor que el registrado en el medio externo.

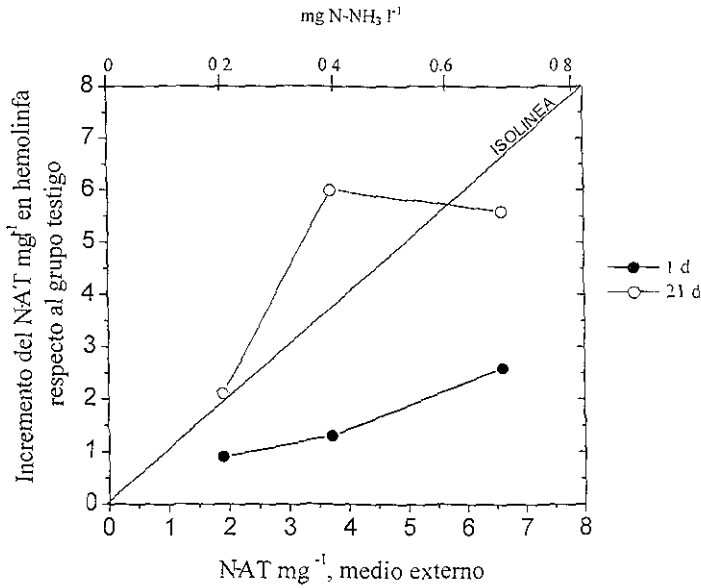


Figura 8. Incremento del amonio en la hemolinfa de los camarones expuestos 1 y 21 d en niveles subletales de amonio, respecto al grupo testigo.

Para estimar los niveles teóricos del  $\text{N-NH}_3$  y  $\text{N-NH}_4^+$  ( $\text{mg l}^{-1}$ ) en la hemolinfa de los camarones y establecer las variaciones entre las concentraciones del medio interno y del medio externo, se utilizó el valor de pH de la hemolinfa de 7.6 (Chen y Cheng, 1993a). De acuerdo al autor, *P. japonicus* el pH del medio interno permanece constante en 7.6 aún en camarones expuestos a  $20.3 \text{ mg N-AT l}^{-1}$ , concentraciones mucho más elevadas que las evaluadas en el presente estudio. De tal manera, a las 24 h de exposición niveles de  $\text{NH}_3$  y de  $\text{NH}_4^+$  incrementaron en un 38 y 36 %, respectivamente sólo en la mayor concentración, de  $0.7 \text{ mg N-NH}_3 \text{ l}^{-1}$  ( $P < 0.05$ ); sin embargo, en la exposición crónica (21 d) a 0.2, 0.4 y  $0.7 \text{ mg N-NH}_3 \text{ l}^{-1}$ , el  $\text{NH}_3$  se incrementó, respecto al grupo testigo, en un 31, 92 y 85 %, respectivamente mientras que el  $\text{NH}_4^+$  fue 29, 84 y 78 % mayor, respectivamente (Tabla 6).

Tabla 6. Niveles teóricos de N-NH<sub>3</sub> y N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (mg l<sup>-1</sup>;  $\bar{X} \pm ES$ ) en hemolinfa de juveniles de *L. setiferus* expuestos 1 y 21 d en concentraciones subletales de amonio.\*

N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> mg l <sup>-1</sup>	N-NH <sub>3</sub> mg l <sup>-1</sup>	Tiempo de exposición, d			
		1		21	
		N-NH <sub>3</sub>	N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	N-NH <sub>3</sub>	N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>
0	0	0.13 ± 0.01 <sup>a1</sup>	6.97 ± 0.28 <sup>a1</sup>	0.13 ± 0.01 <sup>a1</sup>	6.97 ± 0.28 <sup>a1</sup>
1.7	0.2	0.15 ± 0.02 <sup>a1</sup>	7.84 ± 0.82 <sup>a1</sup>	0.17 ± 0.01 <sup>b1</sup>	8.99 ± 0.39 <sup>b1</sup>
3.3	0.4	0.16 ± 0.01 <sup>a1</sup>	8.24 ± 0.75 <sup>a1</sup>	0.25 ± 0.01 <sup>c2</sup>	12.85 ± 0.39 <sup>c2</sup>
5.9	0.7	0.18 ± 0.01 <sup>b1</sup>	9.49 ± 0.54 <sup>b1</sup>	0.24 ± 0.14 <sup>c2</sup>	12.43 ± 0.76 <sup>c2</sup>

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

Números diferentes en la misma fila de cada tiempo de exposición denotan diferencias significativas (P<0.05)

\* valores obtenidos considerando un pH en la hemolinfa de 7.6. (Chen y Cheng, 1993a).

Los niveles base de **urea** (mg urea l<sup>-1</sup>) en la hemolinfa de los camarones del grupo testigo, fue similar en los dos tiempos de exposición (P>0.05; Tabla 7). En los camarones expuestos a las diferentes concentraciones de amonio, la concentración de urea al primer día de exposición no presentó cambios significativos en las diferentes condiciones experimentales (P>0.05), si bien tendió a disminuir al incrementarse la concentración externa de amonio. A los 21 d de exposición al amonio, también se observó una disminución en los niveles internos, de 65, 8 y 45 %, respecto al grupo testigo en 0.2, 0.4 y 0.7 mg N-NH<sub>3</sub> l<sup>-1</sup>, respectivamente; sin embargo, solo en la primera condición ésta disminución fue significativa (P<0.05; Tabla 6, Fig. 9). Al incrementarse el tiempo de exposición al amonio, de 1 a 21 d la concentración de urea en el medio interno fue similar en los camarones del grupo testigo y en los expuestos a 0.2 y a 0.7 mg N-NH<sub>3</sub> l<sup>-1</sup>; solo en los organismos expuestos a 0.4 mg N-NH<sub>3</sub> l<sup>-1</sup> la acumulación a los 21 d fue 86% mayor que al primer día de exposición (P<0.05; Tabla 7).

Tabla 7. Niveles de urea ( $\text{mg l}^{-1}$ ;  $\bar{X} \pm \text{ES}$ ) en la hemolinfa de juveniles de *L. setiferus* expuestos 1 y 21 d en concentraciones subletales de amonio.

NAT $\text{mg l}^{-1}$	N-NH <sub>3</sub> $\text{mg l}^{-1}$	Tiempo de exposición, d	
		1	21
0	0	48.1 $\pm$ 1.8 <sup>a1</sup>	61.1 $\pm$ 6.7 <sup>a1</sup>
1.9	0.2	33.4 $\pm$ 5.0 <sup>a1</sup>	21.4 $\pm$ 5.8 <sup>b1</sup>
3.7	0.4	30.1 $\pm$ 5.1 <sup>a1</sup>	56.0 $\pm$ 9.3 <sup>a2</sup>
6.6	0.7	38.0 $\pm$ 3.1 <sup>a1</sup>	33.5 $\pm$ 5.9 <sup>ab1</sup>

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

Números diferentes en una misma fila denotan diferencias significativas ( $P < 0.05$ ).

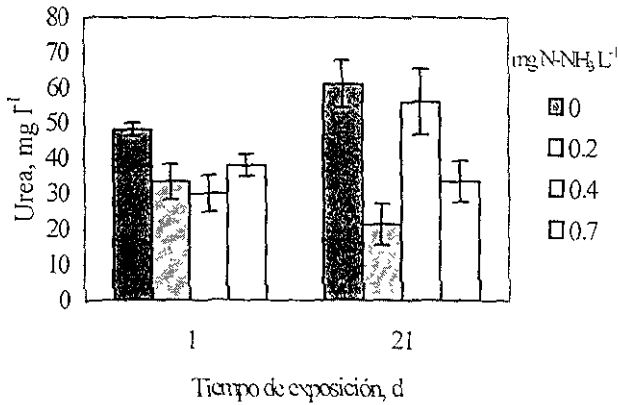


Figura 9. Niveles de urea en la hemolinfa de los juveniles de *L. setiferus* expuestos 1 y 21 d en concentraciones subletales de amonio. Se grafican valores  $\bar{X} \pm \text{ES}$ .

b) Presión osmótica.

La presión osmótica del medio externo de los camarones fue de 737 mOsm  $\text{kg}^{-1}$  correspondiente a una salinidad de  $25 \pm 1\%$ . De tal manera, los juveniles de *L. setiferus* utilizados en los bioensayos presentaron una hemolinfa hiposmótica respecto al medio (Tabla 8, Fig. 10)



Al primer día de exposición la presión osmótica de la hemolinfa de los organismos expuestos a 0.2 y a 0.7 mg N-NH<sub>3</sub> l<sup>-1</sup> fue similar al grupo testigo, mientras que en 0.4 mg N-NH<sub>3</sub> l<sup>-1</sup> ésta fue 22% mayor ( $P < 0.05$ ). A los 21 d de la evaluación no se observaron diferencias significativas entre ninguna de las cuatro condiciones experimentales ( $P > 0.05$ ; Tabla 8, Fig. 10). A los 21 d de transcurrido el bioensayo, la presión osmótica del medio interno de los juveniles del grupo testigo disminuyó 11% respecto al primer día ( $P < 0.05$ ; Tabla 8).

En las cuatro condiciones experimentales, la presión osmótica fue significativamente menor a los 21 d de exposición respecto al primer día de la evaluación. Las disminuciones fueron del 16, 32 y 13% en los organismos expuestos a 0.2, 0.4 y 0.7 mg N-NH<sub>3</sub> l<sup>-1</sup>, respectivamente ( $P < 0.05$ ; Tabla 8).

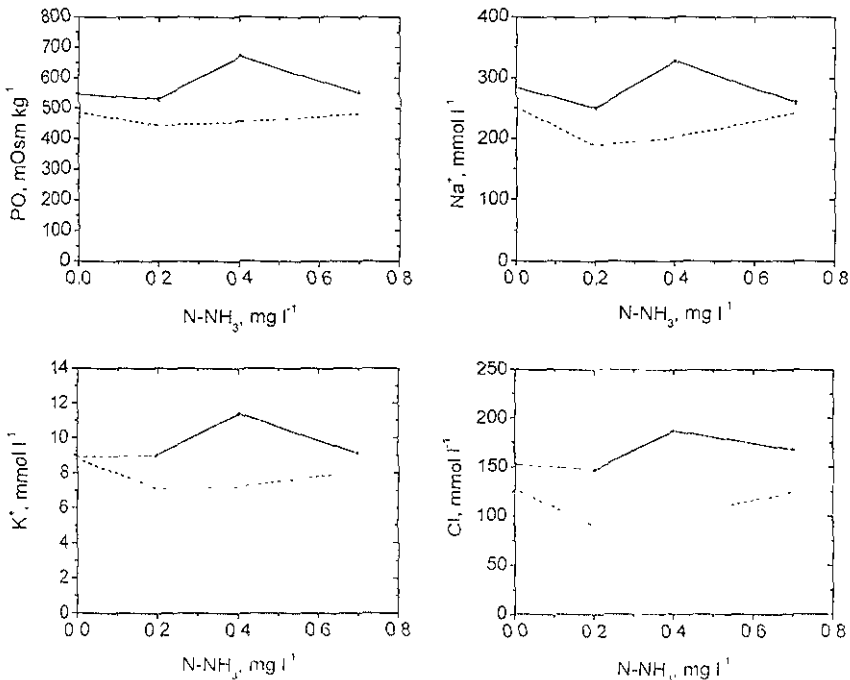


Figura 10. Presión osmótica y niveles de Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup> en la hemolinfa de los juveniles de *Litopenaeus setiferus* expuestos 1 (—) y 21 d (---) en concentraciones subletales de amonio. Se grafican valores  $\bar{X} \pm ES$ .

## c) Iones.

Los niveles de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Cl}^-$  en el medio externo de los camarones fueron similares en todas las condiciones experimentales y en los dos tiempos de evaluación (1 y 21 d), de 357, 9 y 327  $\text{mmol l}^{-1}$ , respectivamente ( $P>0.05$ ; Tabla 8). La contribución de los iones a la presión osmótica del medio externo fue en su orden 51.5, 1.3 y 47.2%.

La concentración del  $\text{Na}^+$  ( $\text{mmol l}^{-1}$ ) en la hemolinfa de los camarones del grupo testigo fue similar en los dos tiempos de exposición al amonio, con un valor promedio de 267.9  $\text{mmol l}^{-1}$ . En los organismos expuestos 1d a 0.2 y 0.7  $\text{mg N-NH}_3 \text{ l}^{-1}$  la concentración de este ion fue similar que la obtenida en el grupo testigo ( $P>0.05$ ); sin embargo, en los expuestos a 0.4  $\text{mg N-NH}_3 \text{ l}^{-1}$  se observó un incremento significativo del 15%. En la exposición a 21 d, el sodio en hemolinfa de los camarones expuestos a 0.7  $\text{mg N-NH}_3 \text{ l}^{-1}$  fue similar al obtenido en el grupo testigo; en contraste, en los expuestos a 0.2 y 0.4  $\text{mg N-NH}_3 \text{ l}^{-1}$  la concentración disminuyó 25 y 19%, respectivamente ( $P<0.05$ ; Tabla 8, Fig. 10).

Así, solo en las condiciones de 0.2 y 0.4  $\text{mg N-NH}_3 \text{ l}^{-1}$  la concentración de  $\text{Na}^+$  a los 21 d de experimentación fue respectivamente 25 y 19% menor que al primer día de exposición ( $P<0.05$ ; Tabla 8).

La concentración del  $\text{K}^+$  ( $\text{mmol l}^{-1}$ ) en los organismos testigo fue similar en los dos tiempos de evaluación con un valor promedio de 8.85  $\text{mmol l}^{-1}$ . La concentración de este ion en los organismos expuestos un día a las concentraciones subletales de amonio fue similar, excepto en los expuestos en 0.4  $\text{mg N-NH}_3 \text{ l}^{-1}$  donde tuvo un incremento significativo del 28% ( $P<0.05$ ). A los 21 d de exposición el grupo expuesto a 0.7  $\text{mg N-NH}_3 \text{ l}^{-1}$  no tuvo diferencias respecto al testigo, sin embargo, en los expuestos a 0.2 y 0.4  $\text{mg N-NH}_3 \text{ l}^{-1}$  los niveles del  $\text{K}^+$  fueron 19 y 18% menores, respectivamente ( $P<0.05$ ; Tabla 8, Fig. 10).

Solo en 0.2 y 0.4  $\text{mg N-NH}_3 \text{ l}^{-1}$  los niveles de  $\text{K}^+$  en la hemolinfa de los camarones se modificaron significativamente al aumentar el tiempo de exposición al amonio; a los 21d de exposición la disminución fue 21 y 37%, respectivamente con relación a la concentración registrada en los camarones expuestos 1 d al amonio ( $P<0.05$ ; Tabla 8).

Las concentraciones del  $\text{Cl}^-$  ( $\text{mmol l}^{-1}$ ) en el medio interno del grupo testigo no presentó diferencias significativas en los dos tiempos de exposición al tóxico y se obtuvo un valor promedio de 140  $\text{mmol l}^{-1}$ . En los organismos expuestos un día al amonio solo se obtuvieron diferencias significativas

respecto al grupo testigo en la concentración de 0.4 mg N-NH<sub>3</sub> l<sup>-1</sup>, que mostró un incremento del 22% (P<0.05). En la exposición a 21d la concentración de este ion en 0.7 mg N-NH<sub>3</sub> l<sup>-1</sup> fue similar que la obtenida en el grupo testigo; en cambio, en 0.2 y 0.4 mg N-NH<sub>3</sub> l<sup>-1</sup> las concentraciones disminuyeron 28 y 22%, respectivamente (P<0.05; Tabla 8, Fig. 10).

En diferentes condiciones experimentales el ion cloro en la hemolinfa de los camarones se modificó significativamente por efecto del tiempo de exposición al amonio. En 0.2, 0.4 y 0.7 mg N-NH<sub>3</sub> l<sup>-1</sup>, las concentraciones disminuyeron significativamente 38, 47 y 26%, respectivamente con relación al primer día de exposición al amonio (P<0.05; Tabla 8).

Tabla 8. Presión osmótica (mOsm kg<sup>-1</sup>; X± ES) y niveles de Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup> (mmol l<sup>-1</sup>; X±ES) en la hemolinfa de juveniles de *Litopenaeus setiferus* expuestos 1 y 21 d en concentraciones subletales de amonio. Los valores de error estándar se señalan entre paréntesis.

N-NH <sub>3</sub> mg l <sup>-1</sup>	PO		Na <sup>+</sup>		K <sup>+</sup>		Cl <sup>-</sup>	
	1d	21d	1d	21d	1d	21d	1d	21d
0	547 <sup>a1</sup> (11)	487 <sup>a2</sup> (18)	284.5 <sup>a1</sup> (9.6)	251.2 <sup>a1</sup> (13.8)	8.9 <sup>a1</sup> (0.6)	8.8 <sup>a1</sup> (0.5)	152.7 <sup>a1</sup> (6.5)	127.2 <sup>a1</sup> (3.9)
0.2	530 <sup>a1</sup> (8)	444 <sup>a2</sup> (14)	259.9 <sup>a1</sup> (3.6)	188.5 <sup>b2</sup> (8.0)	9.0 <sup>a1</sup> (0.3)	7.1 <sup>b2</sup> (0.3)	147.1 <sup>a1</sup> (9.7)	91.0 <sup>b2</sup> (4.0)
0.4	669 <sup>b1</sup> (34)	455 <sup>a2</sup> (3)	328.0 <sup>b1</sup> (9.3)	202.3 <sup>b2</sup> (16.5)	11.4 <sup>b1</sup> (0.7)	7.2 <sup>b2</sup> (0.4)	186.7 <sup>b1</sup> (6.5)	98.7 <sup>b2</sup> (4.4)
0.7	552 <sup>a1</sup> (11)	482 <sup>a2</sup> (21)	260.3 <sup>a1</sup> (5.7)	242.7 <sup>a1</sup> (12.8)	9.1 <sup>a1</sup> (0.3)	8.1 <sup>ab1</sup> (0.4)	167.9 <sup>ab1</sup> (5.4)	124.9 <sup>ab2</sup> (7.5)
Medio externo	737		357		9		327	

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

Números diferentes en la misma fila de cada ion denotan diferencias significativas (P<0.05).

A pesar de las diferencias encontradas tanto en la presión osmótica de la hemolinfa como en la concentración de los iones plasmáticos (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup>) de los camarones expuestos al amonio, la contribución de los iones a la presión osmótica permaneció similar en las diferentes concentraciones experimentales de amonio y en el grupo control, así como en los dos tiempos de exposición (1 y 21 d). Así, el Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup> contribuyeron a la presión osmótica del medio interno de 59.5 a 65.8 %, de 2.0 a 2.3 % y de 31.8 a 38.4 %, respectivamente (Tabla 8; Fig. 10)

#### 4- Análisis de Tejido

##### a) Amonio

La concentración de amonio ( $\mu\text{mol NAT g}^{-1}$  tejido) en la **branquia** de los organismos del grupo testigo no se modificó a lo largo del tiempo de experimentación y presentó un promedio de  $42.6 \mu\text{mol NAT g}^{-1}$  tejido. El nivel de este compuesto después del primer día de exposición, fue significativamente mayor en todas las condiciones experimentales, siendo 56, 59 y 122 % mayor que el grupo testigo en 0.2, 0.4 y 0.7 mg N-NH<sub>3</sub> l<sup>-1</sup>, respectivamente. A los 21 d de exposición los valores de amonio en branquia en los organismos expuestos a 0.4 y 0.7 mg N-NH<sub>3</sub> l<sup>-1</sup> fueron similares a los evaluados en el grupo testigo; en contraste, en los juveniles expuestos a 0.2 mg N-NH<sub>3</sub> l<sup>-1</sup> la concentración se incrementó 41% de manera significativa ( $P < 0.05$ ; Tabla 9, Fig. 11).

Tabla 9. Niveles de amonio ( $\mu\text{mol g}^{-1}$  tej;  $\bar{X} \pm \text{ES}$ ) en branquia de juveniles de *Litopenaeus setiferus* expuestos 1 y 21 d en concentraciones subletales de amonio.

NAT mg l <sup>-1</sup>	N-NH <sub>3</sub> mg l <sup>-1</sup>	Tiempo de exposición, d	
		1	21
0	0	42.7 ± 3.8 <sup>a1</sup>	42.5 ± 8.0 <sup>a1</sup>
1.9	0.2	66.5 ± 4.8 <sup>b1</sup>	72.0 ± 5.6 <sup>b1</sup>
3.7	0.4	67.9 ± 5.5 <sup>b1</sup>	38.8 ± 2.2 <sup>a2</sup>
6.6	0.7	94.7 ± 4.7 <sup>c1</sup>	40.0 ± 7.6 <sup>a2</sup>

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

Números diferentes en una misma fila denotan diferencias significativas ( $P < 0.05$ )

Al aumentar el período de exposición al amonio de 1 a 21 d la acumulación del amonio en este tejido disminuyó de manera significativa en las concentraciones de 0.4 y 0.7 mg N-NH<sub>3</sub> l<sup>-1</sup> a magnitudes de 43 y 58 %, respectivamente ( $P < 0.05$ ). En contraste, en 0.2 mg N-NH<sub>3</sub> l<sup>-1</sup> las concentraciones no presentaron diferencias significativas entre los dos tiempos de evaluación ( $P > 0.05$ ; Tabla 9).

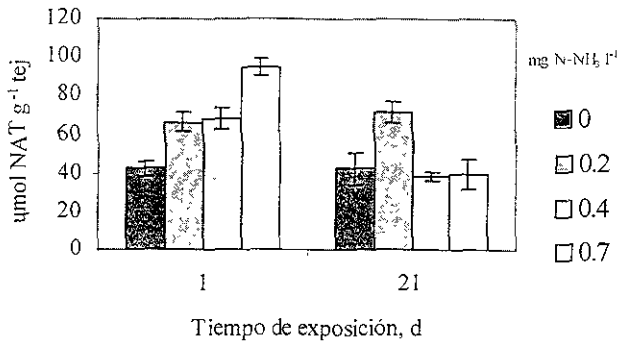


Figura 11. Niveles de amonio en branquia de juveniles de *Litopenaeus setiferus* expuestos 1 y 21 d en concentraciones subletales de amonio. Se grafican valores  $\bar{X} \pm \text{ES}$ .

La concentración de amonio ( $\mu\text{mol NAT g}^{-1} \text{ tejido}$ ) en el **hepatopáncreas** del grupo testigo fue similar en los dos tiempos de evaluación con un valor promedio de  $148.2 \mu\text{mol NAT g}^{-1} \text{ tejido}$ . En el primer día de exposición al amonio el nivel de este compuesto en los organismos expuestos en  $0.4 \text{ mg N-NH}_3 \text{ l}^{-1}$  fue similar al obtenido en el grupo testigo; sin embargo, en  $0.2$  y  $0.7 \text{ mg N-NH}_3 \text{ l}^{-1}$  se observó un incremento de 48 y 114%, respectivamente ( $P < 0.05$ ). A los 21 d de exposición, la concentración de este tóxico en el tejido fue 67, 87 y 117% mayor respecto al grupo testigo, en los camarones expuestos a  $0.2$ ,  $0.4$  y  $0.7 \text{ mg N-NH}_3 \text{ l}^{-1}$ , respectivamente ( $P < 0.05$ ; Tabla 10, Fig. 12).

Tabla 10. Niveles de amonio ( $\mu\text{mol NAT g}^{-1} \text{ tej}$ ;  $\bar{X} \pm \text{ES}$ ) en hepatopáncreas de juveniles de *Litopenaeus setiferus* expuestos 1 y 21 d en amonio.

NAT $\text{mg l}^{-1}$	N-NH <sub>3</sub> $\text{mg l}^{-1}$	Tiempo de exposición, d	
		1	21
0	0	$148.2 \pm 9.7^{\text{a1}}$	$148.2 \pm 9.7^{\text{a1}}$
1.9	0.2	$219.2 \pm 10.8^{\text{b1}}$	$247.2 \pm 32.8^{\text{b1}}$
3.7	0.4	$145.6 \pm 16.7^{\text{a1}}$	$276.8 \pm 10.5^{\text{b2}}$
6.6	0.7	$317.2 \pm 8.1^{\text{c1}}$	$321.5 \pm 8.7^{\text{b1}}$

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

Números diferentes en una misma fila denotan diferencias significativas ( $P < 0.05$ )

En las concentraciones de 0.2 y 0.7 mg N-NH<sub>3</sub> l<sup>-1</sup>, la exposición crónica al amonio no modificó los niveles de amonio en este tejido y se mantuvo semejante que en el primer día de exposición al tóxico. En cambio, en 0.4 mg N-NH<sub>3</sub> l<sup>-1</sup> se obtuvo un incremento del 90% a los 21 de exposición, respecto al primer día ( $P < 0.05$ ; Tabla 10).

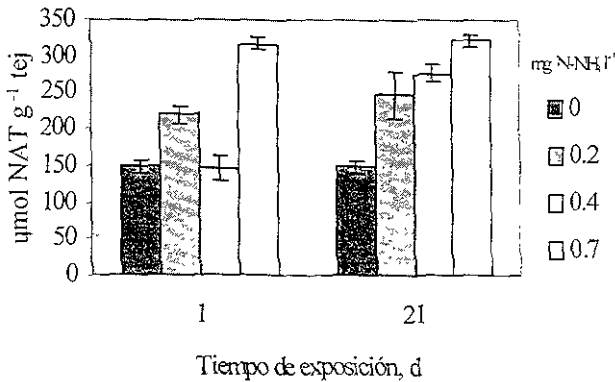


Figura 12. Niveles de amonio en hepatopáncreas de juveniles de *Litopenaeus setiferus* expuestos 1 y 21 d en concentraciones subletales de amonio. Se grafican valores  $\bar{X} \pm ES$ .

La concentración de amonio en el **músculo** de los juveniles del grupo testigo, permaneció sin cambios significativos en los tiempos de evaluación con un valor promedio de 40.05  $\mu\text{mol NAT g}^{-1}$  tejido ( $P > 0.05$ ). En los camarones sujetos a la exposición de amonio no se presentaron diferencias significativas en el primer día de evaluación entre ninguna de las condiciones experimentales; de igual forma, los niveles de amonio en tejido, a los 21 días de exposición no presentaron cambios significativos ( $P > 0.05$ ; Tabla 11, Fig. 13).

Tabla 11. Niveles de amonio ( $\mu\text{mol N-AT g}^{-1}$  tej;  $\bar{X} \pm \text{ES}$ ) en músculo de juveniles de *Litopenaeus setiferus* expuestos 1 y 21d en amonio.

NAT $\text{mg l}^{-1}$	N-NH <sub>3</sub> $\text{mg l}^{-1}$	Tiempo de exposición, d	
		1	21
0	0	42.17 $\pm$ 1.39 <sup>a1</sup>	37.93 $\pm$ 2.97 <sup>a1</sup>
1.9	0.2	42.19 $\pm$ 2.91 <sup>a1</sup>	38.90 $\pm$ 1.77 <sup>a1</sup>
3.7	0.4	39.07 $\pm$ 3.02 <sup>a1</sup>	45.85 $\pm$ 1.99 <sup>a1</sup>
6.6	0.7	45.01 $\pm$ 2.49 <sup>a1</sup>	43.27 $\pm$ 2.34 <sup>a1</sup>

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

Números diferentes en una misma fila denotan diferencias significativas ( $P < 0.05$ ).

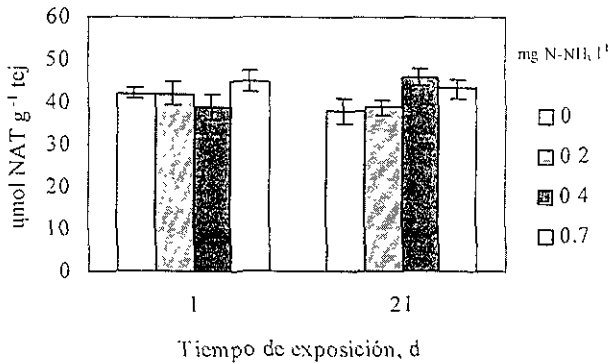


Figura 13. Amonio en músculo de juveniles de *Litopenaeus setiferus* expuestos en concentraciones subletales de amonio. Se grafican valores  $\bar{X} \pm \text{ES}$ .

Los niveles de amonio en el músculo de los camarones no se vieron afectados por el tiempo de experimentación a las diferentes concentraciones de amonio, a pesar de que en los organismos expuestos a 0.4 mg N-NH<sub>3</sub> l<sup>-1</sup> se observó un incremento del 17%, éste no es significativo ( $P > 0.05$ ; Tabla 11)

## b) Urea.

La concentración de urea en la **branquia** ( $\text{mmol urea g}^{-1}$  tejido) de los organismos del grupo testigo fue similar en los dos tiempos de evaluación con valores promedio de  $2.1 \text{ mmol Urea g}^{-1}$  tejido. Al primer día de exposición al amonio en los organismos expuestos a  $0.2$  y  $0.4 \text{ mg N-NH}_3 \text{ l}^{-1}$  no se obtuvieron diferencias significativas respecto el grupo testigo; en contraste, en los camarones expuestos a  $0.7 \text{ mg N-NH}_3 \text{ l}^{-1}$  se obtuvo un incremento significativo de  $116\%$  ( $P < 0.05$ ). A los 21 d de exposición, los niveles de urea fueron similares en todas las condiciones experimentales ( $P > 0.05$ ; Tabla 12, Fig. 14).

Tabla 12. Niveles de urea ( $\text{mmol g}^{-1}$  tej;  $\bar{X} \pm \text{ES}$ ) en branquia de los juveniles de *Litopenaeus setiferus* expuestos 1 y 21 d en concentraciones subletales de amonio.

NAT $\text{mg l}^{-1}$	N-NH <sub>3</sub> $\text{mg l}^{-1}$	Tiempo de exposición, d	
		1	21
0	0	$2.5 \pm 0.3^{\text{a1}}$	$1.7 \pm 0.6^{\text{a1}}$
1.9	0.2	$2.7 \pm 0.4^{\text{a1}}$	$1.8 \pm 0.4^{\text{a1}}$
3.7	0.4	$2.0 \pm 0.2^{\text{a1}}$	$2.7 \pm 0.5^{\text{a1}}$
6.6	0.7	$5.4 \pm 1.0^{\text{b1}}$	$1.5 \pm 0.1^{\text{a12}}$

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

Números diferentes en una misma fila denotan diferencias significativas ( $P < 0.05$ ).

La acumulación de urea en la branquia de los camarones expuestos durante 21 d en  $0.7 \text{ mg N-NH}_3 \text{ l}^{-1}$  presentó una disminución del  $72\%$  respecto al primer día. En el resto de las condiciones experimentales, la concentración de amonio en el tejido branquial no se vio afectado por el tiempo de exposición al tóxico ( $P > 0.05$ ; Tabla 13).



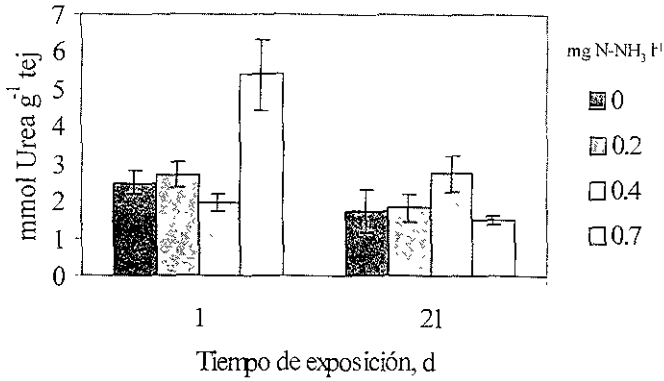


Figura 14. Niveles de urea en branquia de los juveniles de *Litopenaeus setiferus* expuestos 1 y 21 d en concentraciones subletales de amonio. Se grafican valores  $\bar{X} \pm ES$ .

La concentración de la urea en el **hepatopáncreas** (mmol Urea g<sup>-1</sup> tejido) de los organismos del grupo testigo fue similar al primer día y a los 21 d de transcurrido el bioensayo con valores promedio de 0.85 mmol Urea g<sup>-1</sup> tejido ( $P > 0.05$ ). En los grupos expuestos al amonio no se observaron diferencias significativas en los dos tiempos de evaluación y tampoco se observó un efecto tiempo en ninguna de las condiciones experimentales ( $P > 0.05$ ; Tabla 13, Fig. 15).

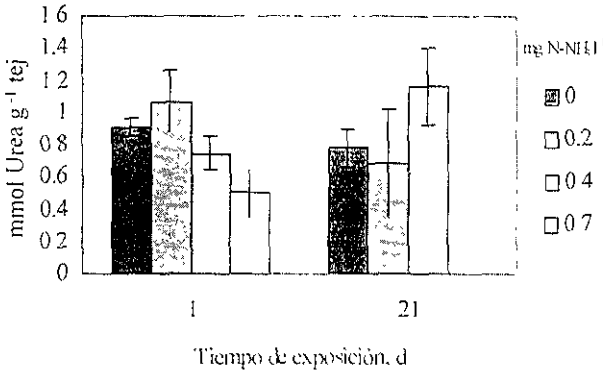


Figura 15. Urea en hepatopáncreas de juveniles de *Litopenaeus setiferus* expuestos en concentraciones subletales de amonio. Se grafican valores  $\bar{X} \pm ES$ .

Tabla 13. Niveles de urea ( $\text{mmol urea g}^{-1}$  tej;  $\bar{X} \pm \text{ES}$ ) en hepatopáncreas de juveniles de *Litopenaeus setiferus* expuestos 1 y 21d en amonio.

NAT $\text{mg l}^{-1}$	N-NH <sub>3</sub> $\text{mg l}^{-1}$	Tiempo de exposición, d	
		1	21
0	0	$0.91 \pm 0.06^{a1}$	$0.78 \pm 0.12^{a1}$
1.9	0.2	$1.07 \pm 0.19^{a1}$	$0.69 \pm 0.34^{a1}$
3.7	0.4	$0.75 \pm 0.11^{a1}$	$1.16 \pm 0.24^{a1}$
6.6	0.7	$0.50 \pm 0.15^{a1}$	Nd

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

Números diferentes en una misma fila denotan diferencias significativas ( $P < 0.05$ ).

nd= no determinado.

## 5. Actividad de Arginasa.

La actividad enzimática de la arginasa ( $\mu\text{mol ornitina min}^{-1} \text{g}^{-1}$  tejido) en la **bránquia** de los organismos del grupo testigo, se mantuvo sin cambios en todo el proceso de experimentación con valores promedio de  $13.7 \mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$  tejido. Cabe señalar que estos valores se mantuvieron por debajo del resto de los *grupos experimentales*. En el primer día de exposición al amonio, la actividad de la arginasa se incrementó 211, 75 y 81% en 0.2, 0.4 y 0.7 mg N-NH<sub>3</sub> l<sup>-1</sup> respectivamente, si bien solo se obtuvieron diferencias significativas en la primera condición ( $P < 0.05$ ). A los 21 d de exposición al amonio, la actividad de la enzima se incrementó a medida que se incrementó la concentración externa de amonio en los camarones expuestos a 0.2 y 0.7 mg N-NH<sub>3</sub> l<sup>-1</sup> con incrementos de 177 y 383%, respectivamente ( $P < 0.05$ ). En 0.4 mg N-NH<sub>3</sub> l<sup>-1</sup> la actividad enzimática fue similar al grupo testigo ( $P > 0.05$ ; Tabla 14, Fig. 16).

La actividad de la enzima no se modificó en los dos tiempos de evaluación, excepto en la mayor concentración del tóxico donde se observó un incremento significativo de 221% a los 21d de exposición respecto al primer día de evaluación ( $P < 0.05$ ; Tabla 14).

Tabla 14. Actividad de la arginasa ( $\mu\text{mol min}^{-1}\text{g}^{-1}$  tejido;  $\bar{X}\pm\text{ES}$ ) en branquia de los juveniles de *Litopenaeus setiferus* expuestos 1 y 21 d en concentraciones subletales de amonio.

NAT $\text{mg l}^{-1}$	N-NH <sub>3</sub> $\text{mg l}^{-1}$	Tiempo de exposición, d	
		1	21
0	0	$16.2 \pm 1.5^{\text{a1}}$	$11.2 \pm 3.1^{\text{a1}}$
1.9	0.2	$50.4 \pm 9.5^{\text{b1}}$	$31.0 \pm 4.3^{\text{b1}}$
3.7	0.4	$28.4 \pm 4.6^{\text{a1}}$	$17.3 \pm 3.1^{\text{a1}}$
6.6	0.7	$29.3 \pm 0.4^{\text{a1}}$	$54.1 \pm 7.5^{\text{c2}}$

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

Números diferentes en una misma fila denotan diferencias significativas ( $P < 0.05$ ).

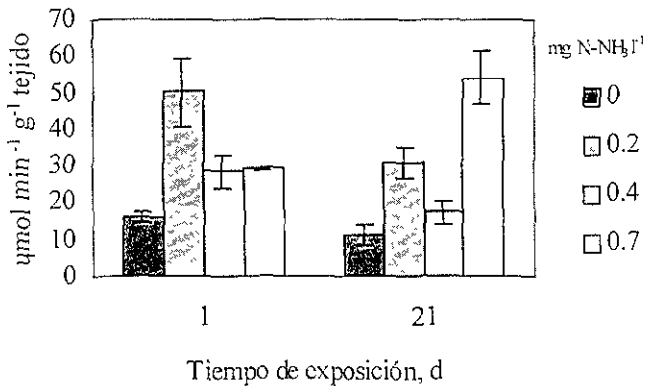


Figura 16. Actividad de la arginasa en branquia de los juveniles de *Litopenaeus setiferus* expuestos 1 y 21 d en concentraciones subletales de amonio. Se grafican valores  $\bar{X}\pm\text{ES}$ .

La actividad de la arginasa en el **hepatopáncreas** de los juveniles del grupo control se mantuvo sin cambios en los dos tiempos de evaluación con un valor promedio  $0.14 \mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$  tejido; un comportamiento similar se observó en  $0.4 \text{ mg N-NH}_3 \text{ l}^{-1}$ . Al primer día de exposición al amonio en  $0.2$  y  $0.7 \text{ mg N-NH}_3 \text{ l}^{-1}$  la actividad enzimática respecto al grupo testigo se incrementó 11 y 7 veces, respectivamente. A los 21 d de exposición al compuesto nitrogenado la actividad de la arginasa se

incrementó a medida de que se incrementó la concentración externa de amonio en los camarones expuestos a 0.2 y 0.7 mg N-NH<sub>3</sub> l<sup>-1</sup> respecto al grupo testigo aumentaron 4 y 9 veces, respectivamente (Tabla 15, Fig. 17).

Tabla 15. Actividad de la arginasa ( $\mu\text{mol min}^{-1}\text{g}^{-1}\text{tejido}$ ;  $\bar{X} \pm \text{ES}$ ) en hepatopáncreas de los juveniles de *Litopenaeus setiferus* expuestos 1 y 21 d en concentraciones subletales de amonio.

NAT mg l <sup>-1</sup>	N-NH <sub>3</sub> Mg l <sup>-1</sup>	Tiempo de exposición, d	
		1	21
0	0	0.14 ± 0.01 <sup>a1</sup>	0.14 ± 0.01 <sup>a1</sup>
1.9	0.2	1.57 ± 0.22 <sup>c1</sup>	0.51 ± 0.06 <sup>a2</sup>
3.7	0.4	0.12 ± 0.01 <sup>a1</sup>	0.08 ± 0.00 <sup>a1</sup>
6.6	0.7	1.00 ± 0.21 <sup>b1</sup>	1.24 ± 0.20 <sup>b1</sup>

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

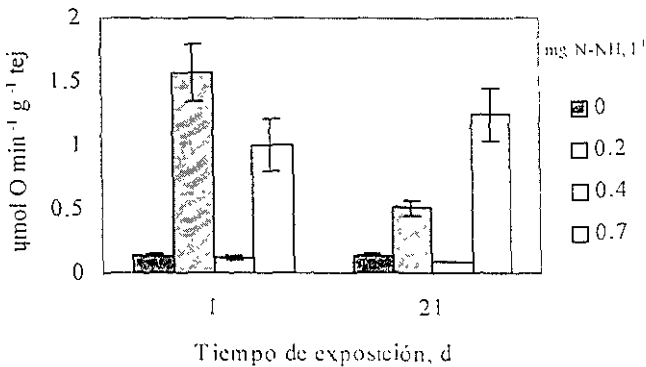


Figura 17. Actividad de la arginasa en hepatopáncreas de los juveniles de *Litopenaeus setiferus* expuestos 1 y 21 d en concentraciones subletales de amonio. Se grafican valores  $\bar{X} \pm \text{ES}$ .

La actividad de la enzima en los camarones expuestos durante 21 d en 0.2 mg N-NH<sub>3</sub> l<sup>-1</sup> disminuyó 3 veces respecto al primer día de exposición. En 0.4 y 0.7 mg N-NH<sub>3</sub> l<sup>-1</sup> la enzima tuvo una actividad similar en ambos tiempos de exposición (P>0.05; Tabla 15).

La actividad enzimática de la arginasa en el **músculo** del grupo control no presentó cambios durante el bioensayo y se obtuvieron actividades promedio de 0.14 μmol min<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup> tejido. En el primer día de exposición al amonio la actividad enzimática se incrementó significativamente en los camarones expuestos a 0.2 y 0.7 mg N-NH<sub>3</sub> l<sup>-1</sup>, con incrementos de 3 y 55 veces, respecto al grupo testigo. De igual forma, a los 21 d de exposición la actividad de la enzima se incrementó, en relación con el grupo testigo, 4.5 y 8.5 veces en 0.2 y 0.7 mg N-NH<sub>3</sub> l<sup>-1</sup>, respectivamente (P<0.05). En contraste en 0.4 mg N-NH<sub>3</sub> l<sup>-1</sup> la actividad enzimática no se modificó durante la exposición al amonio (P>0.05; Tabla 16, Fig. 18).

El efecto del tiempo de exposición al amonio en la actividad de la enzima, sólo se observó de manera significativa en la mayor concentración de 0.7 mg N-NH<sub>3</sub> l<sup>-1</sup> con un incremento de 2.4 veces a los 21 d respecto al primer día de exposición (P<0.05; Tabla 16).

Tabla 16. Actividad de la arginasa (μmol min<sup>-1</sup>g<sup>-1</sup>tejido;  $\bar{X} \pm ES$ ) en músculo de los juveniles de *Litopenaeus setiferus* expuestos 1 y 21 d en concentraciones subletales de amonio.

NAT mg l <sup>-1</sup>	N-NH <sub>3</sub> mg l <sup>-1</sup>	Tiempo de exposición, d	
		1	21
0	0	0.11 ± 0.03 <sup>a1</sup>	0.17 ± 0.01 <sup>a1</sup>
1.9	0.2	0.48 ± 0.04 <sup>b1</sup>	0.77 ± 0.14 <sup>b1</sup>
3.7	0.4	0.24 ± 0.09 <sup>a1</sup>	0.09 ± 0.01 <sup>a1</sup>
6.6	0.7	0.60 ± 0.07 <sup>b1</sup>	1.45 ± 0.39 <sup>c2</sup>

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

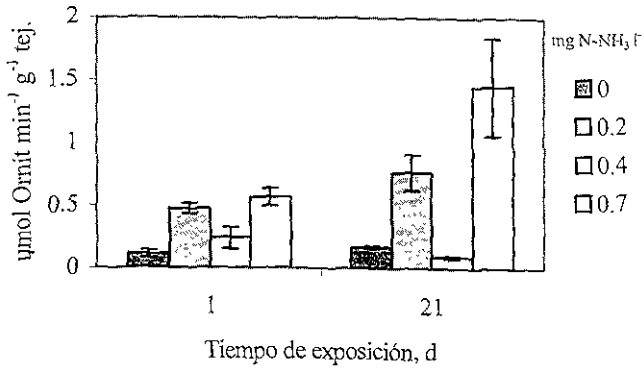


Figura 18. Actividad de la arginasa en el músculo de los juveniles de *Litopenaeus setiferus* expuestos 1 y 21 d en concentraciones subletales de amonio. Se grafican valores  $\bar{X} \pm \text{ES}$ .

## DISCUSIÓN

En los organismos acuáticos, el consumo de oxígeno como medida indirecta del metabolismo aerobio es considerado como un indicador global de su condición fisiológica (Schreck, 1990). La tasa metabólica puede ser alterada a diferentes niveles dependiendo tanto del grado como del tiempo de exposición a un estresor ambiental como el amonio (Jensen *et al.*, 1993).

En los juveniles de *L. setiferus* del grupo testigo, la tasa metabólica ( $0.36 \text{ mg O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ PH}$ ) se encuentra en el intervalo reportado para los juveniles de la especie ( $0.28\text{-}0.51 \text{ mg O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ PH}$ ; Vanegas, 1996) y semejante a la obtenida en juveniles de *P. japonicus* ( $0.30 \text{ mg O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ PH}$ ; Chen y Lai, 1992). Sin embargo, la tasa respiratoria fue menor a la reportada en los juveniles de *L. setiferus* ( $1.53\text{-}2.08 \text{ mg O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ PH}$ ) mantenidos en 15 y 35 ‰ (Rosas *et al.*, 1999). La diferencia en el comportamiento del consumo de oxígeno entre organismos de la misma especie mantenidos en la condición testigo, puede deberse a la diferencia de talla, así como a las diferentes condiciones experimentales.

A diferencia de otras especies de peneidos, como los juveniles de *P. chinensis* y las postlarvas de *L. vannamei* y *L. setiferus* donde la alteración en el consumo de oxígeno por efecto de la exposición al amonio externo sucede de manera inmediata (Chen *et al.*, 1991; Molina, 1998 y Alcaraz *et al.*, 1999) en los juveniles de *L. setiferus* la tasa metabólica no muestra los efectos de este contaminante en las primeras horas de exposición al amonio. Este comportamiento, semejante al obtenido en juveniles de *P. chinensis*, sugiere una tolerancia al amonio en periodos cortos de exposición, de 4 h (Chen y Lin, 1992).

Las alteraciones observadas en la tasa metabólica de *L. setiferus* a las 24 h de exposición pueden ser reflejo de los diferentes niveles de acción tóxica del amonio. Varios autores relacionan el efecto del amonio en el consumo de oxígeno de los organismos acuáticos, con alteraciones histopatológicas, bioquímicas y fisiológicas. Fromm y Gillette (1968) señalan que el amonio puede originar la inhibición del ciclo de Krebs debido a la disminución en las concentraciones del  $\alpha$ -cetoglutarato y del oxalacetato durante la transaminación. Así mismo, Jobling (1994) señala que los cambios en la tasa metabólica pueden ser originados por alteraciones histopatológicas en la estructura de las lamelas secundarias de las branquias, originando una reducción en la superficie del área sobre las cuales el intercambio de los gases y de los iones no ocurre eficientemente.

En los juveniles de *L. setiferus* expuestos 24 h al amonio el aumento en el consumo de oxígeno a medida de que se incrementó la concentración externa de amonio puede sugerir el aumento en la

demanda energética de los organismos para contrarrestar la acción tóxica del amonio, no obstante que la amplitud metabólica se mantuvo sin cambios respecto al grupo testigo. Así mismo, en los organismos expuestos a la mayor concentración de amonio ( $0.7 \text{ mg N-NH}_3 \text{ l}^{-1}$ ) el incremento en el consumo de oxígeno puede relacionarse a su vez con la acumulación significativa de amonio en su medio interno, en contraste con lo observado en los camarones expuestos a  $0.2$  y  $0.4 \text{ mg N-NH}_3 \text{ l}^{-1}$  en donde el amonio no se incrementó en la hemolinfa. Incrementos en el consumo de oxígeno han sido reportados en postlarvas de *L. vannamei* al exponerse  $24 \text{ h}$  a  $0.2$  y  $0.6 \text{ mg N-NH}_3 \text{ l}^{-1}$  (Molina, 1998).

Por otro lado, Smart (1981) sugiere que las primeras reacciones de peces expuestos en amonio son la hiperventilación y la hiperexcitabilidad que pueden a su vez reflejarse en el incremento del consumo de oxígeno de los organismos. Es posible sugerir que tales modificaciones puedan a su vez relacionarse con el aumento en la tasa metabólica desencadenada en *L. setiferus*.

En *L. setiferus* expuestos a  $0.4$  y  $0.7 \text{ mg N-NH}_3 \text{ l}^{-1}$  la modificación del ritmo respiratorio al pasar de bimodal a unimodal puede ser reflejo del efecto tóxico del amonio a nivel neural (Hastings *et al.*, 1991). A su vez, la reducción en el consumo de oxígeno de los organismos expuestos  $24 \text{ h}$  a  $0.4 \text{ mg N-NH}_3 \text{ l}^{-1}$  puede ser resultado de alteraciones en la actividad locomotora de los juveniles debido a su carácter neurotóxico. Este comportamiento lo proponen Alcaraz *et al.* (1997) quienes sugieren que el amonio inhibe la actividad locomotora de postlarvas de *L. setiferus* en exposiciones cortas a  $0.75$  y  $1.0 \text{ mg N-NH}_3 \text{ l}^{-1}$ . En el presente estudio, a lo largo de la exposición crónica se pudo observar de manera cualitativa la reducción en la actividad locomotora de los organismos expuestos al amonio, siendo más evidente en los organismos expuestos a  $0.7 \text{ mg N-NH}_3 \text{ l}^{-1}$ . Este comportamiento ha sido demostrado por Alejandro (2001) en juveniles de la especie expuestos en concentraciones subletales de amonio, en los que la actividad locomotora disminuye al incrementarse la concentración externa de amonio.

La tasa metabólica y la amplitud metabólica de los organismos expuestos  $21 \text{ d}$  en las concentraciones subletales de amonio no se ven alteradas, a diferencia de los camarones expuestos a  $0.2 \text{ mg N-NH}_3 \text{ l}^{-1}$  donde el incremento puede ser reflejo de la demanda energética para reducir el efecto tóxico crónico del amonio. Este incremento difiere al obtenido en primeros juveniles de la misma especie donde en concentraciones similares de amonio, la tasa metabólica no se modificó al cabo de  $10 \text{ d}$  de exposición (Robles, 1997). En contraste, en postlarvas de *L. vannamei*, la tasa metabólica se redujo al ser expuestos  $12 \text{ d}$  en  $0.2$ ,  $0.4$  y  $0.6 \text{ mg N-NH}_3 \text{ l}^{-1}$  (Molina, 1998)



A pesar de que el consumo de oxígeno de los organismos expuestos 21 d presentó niveles similares al grupo testigo, éste no está reflejando el efecto adverso del amonio en los organismos expuestos a  $0.7 \text{ mg N-NH}_3 \text{ l}^{-1}$  debido a la mortalidad del 30% registrada al cabo del bioensayo. Lo anterior sugiere que en esta concentración los mecanismos de compensación y de desintoxicación a la exposición crónica de amonio no son eficientes, lo cual se refleja a su vez en la acumulación significativa de amonio en el medio interno de los camarones.

Los resultados obtenidos en *L. setiferus* denotan la sensibilidad de estadio y de la especie al efecto tóxico del amonio ya que concentraciones de amonio, aún de  $0.2 \text{ mg N-NH}_3 \text{ l}^{-1}$  ( $1.7 \text{ mg N-AT l}^{-1}$ ) y exposiciones cortas alteran el metabolismo respiratorio de los camarones. Estos resultados contrastan con lo reportado en otras especies como en juveniles de *P. chinensis* donde la exposición de 10 a 20 h a  $0.2, 0.8$  y  $1.4 \text{ mg N-NH}_3 \text{ l}^{-1}$  no modifica el consumo de oxígeno de los organismos (Chen *et al.*, 1991), lo cual puede ser reflejo de una mayor tolerancia al amonio.

En los juveniles del grupo testigo, la excreción de amonio ( $19.07\text{-}21.13 \text{ } \mu\text{g NAT h}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ PH}$ ) fue semejante a la obtenida en subadultos de *P. monodon*. En los juveniles de *L. setiferus*, la excreción nitrogenada no se modificó por la exposición de 24 h al amonio externo. Estos resultados difieren al reportado en diferentes especies de peneidos en períodos similares de exposición; en subadultos de *P. monodon* esta respuesta fisiológica se inhibe (Chen y Cheng, 1993b; Chen *et al.*, 1994). En los juveniles de *P. chinensis* la excreción de amonio se incrementó al exponerse en concentraciones subletales de amonio (Chen *et al.*, 1991).

En los camarones peneidos la alteración en las tasas de excreción nitrogenada por efecto de la exposición al amonio se ha relacionado con la acumulación del compuesto en el medio interno de los camarones (Chen y Cheng, 1993a; Schmitt y Santos, 1999). Sin embargo, en los juveniles de *L. setiferus* expuestos 24 h a la mayor concentración de amonio ( $0.7 \text{ mg N-NH}_3 \text{ l}^{-1}$ ) la excreción de amonio no se modificó aún cuando la acumulación de amonio en hemolinfa fue significativa, lo cual sugiere la participación de mecanismos de eliminación del amonio.

En contraste, la reducción aún a valores negativos en la excreción nitrogenada de *L. setiferus* se observó por efecto de la exposición crónica al amonio (21 d) en los camarones expuestos a  $0.2$  y  $0.4 \text{ mg N-NH}_3 \text{ l}^{-1}$ . Este comportamiento se relaciona con la acumulación de amonio en la hemolinfa de los camarones, la cual fue mayor al aumentar la concentración externa de amonio. La inversión de la excreción nitrogenada de los organismos puede indicar que en estas concentraciones los organismos se encuentran transformando el amonio en otro compuesto nitrogenado que es acumulado en forma no tóxica o eliminado al medio externo, lo que determina que se siga incorporando en el organismo

el amonio del medio externo. Resultados similares son reportados en subadultos de *P. monodon* donde la "inhibición" en la excreción nitrogenada se relaciona con la acumulación de amonio en la hemolinfa producto de la inversión en el gradiente normal de difusión del amonio del medio interno al medio externo (Chen y Cheng, 1993b; Chen *et al.*, 1994).

En los juveniles de *L. setiferus*, la concentración de amonio total en hemolinfa fue mayor que en el medio externo lo cual sugiere un gradiente que permite la difusión del amonio del interior al exterior de los organismos. De acuerdo a los valores teóricos de  $\text{NH}_3$  y  $\text{NH}_4^+$  en la hemolinfa, en donde la concentración de  $\text{NH}_4^+$  es mayor en el medio interno y la concentración de  $\text{NH}_3$  es menor que en el exterior, es posible sugerir que en los camarones expuestos por 24 h al amonio, la excreción nitrogenada ocurra fundamentalmente por difusión paracelular del  $\text{NH}_4^+$  a favor del gradiente de concentración o bien por el intercambio iónico del  $\text{NH}_4^+/\text{Na}^+$  lo cual a su vez implicaría el aumento de  $\text{Na}^+$  en la hemolinfa de los camarones, si la enzima que esta actuando en este intercambio es la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa como lo sugiere Wilkie (1997). Randall *et al.*, (1997) señala que la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa es altamente selectiva; sin embargo, Wilkie (1997) la propone como el transportador activo del  $\text{NH}_4^+/\text{Na}^+$  para ciertos peces. Estos mecanismos de excreción permitirían a su vez la reducción del amonio acumulado en la hemolinfa en particular en los camarones expuestos a  $0.7 \text{ mg N-NH}_3 \text{ l}^{-1}$ . La difusión paracelular del  $\text{NH}_4^+$  al medio externo es una ruta importante de eliminación del amonio en organismos acuáticos adaptados a ambientes salobres y marinos debido a que carecen de uniones paracelulares fuertes como en el caso de organismos dulceacuícolas, a su vez la sustitución del  $\text{NH}_4^+$  por el  $\text{K}^+$  a nivel de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa y/o el cotransporte  $\text{Na}^+/\text{2Cl}^-/\text{K}^+$  pueden tener contribuciones importantes en la excreción de amonio (Wilkie, 1997).

La inversión (valores negativos) en la excreción nitrogenada en los camarones expuestos de manera crónica al amonio explica la acumulación de este compuesto más que una inhibición global en la excreción nitrogenada como lo sugieren Chen y Lai (1992). Así, es probable suponer que el aumento en las concentraciones de amonio externo (fundamentalmente como  $\text{NH}_4^+$ ) enmascara aún la poca eliminación de amonio que pudiera ocurrir. La acumulación de amonio se evidencia por el incremento significativo de éste en el medio interno de los juveniles conforme aumenta la concentración externa de amonio.

En los juveniles de *L. setiferus* expuestos al amonio, la concentración de  $\text{NH}_3$  en el medio externo es mayor que en el medio interno de los camarones, lo cual establece un gradiente que permite la difusión del  $\text{NH}_3$  inverso al de  $\text{NH}_4^+$ , del medio externo al medio interno de los organismos. De tal manera, el incremento de amonio en los juveniles puede ser debido a la incorporación por difusión del  $\text{NH}_3$  del medio externo a la hemolinfa de los camarones.

A pesar de que la acumulación del amonio en la hemolinfa de los organismos expuestos 21 d a 0.7 mg N-NH<sub>3</sub> l<sup>-1</sup> fue semejante que en 0.4 mg N-NH<sub>3</sub> l<sup>-1</sup>, la excreción de este compuesto se vio favorecida; sin embargo, los mecanismos de eliminación de este tóxico no fueron tan eficientes debido a la mortalidad registrada (30%) en esta condición experimental. Lo anterior hace sugerir que en condiciones crónicas el amonio en concentraciones externas de 0.7 mg N-NH<sub>3</sub> l<sup>-1</sup> es letal en los juveniles de *L. setiferus*. La mortalidad pudo deberse al costo energético relacionado con el efecto tóxico global del amonio, aunado a la disminución de la alimentación de los camarones, la cual fue determinada cualitativamente.

Cabe señalar que los niveles de amonio en la hemolinfa los organismos de *L. setiferus* del grupo testigo es semejante al obtenido en *P. monodon* (7.13 mg NAT l<sup>-1</sup>). Sin embargo, es mayor a la obtenida en organismos de *P. japonicus* (2.98 mg NAT l<sup>-1</sup>; Chen y Kou, 1991) y menor a la de juveniles de la misma especie (13.6 mg NAT l<sup>-1</sup>; Ríos, 2001). Las diferencias entre estas respuestas, además de las causas interespecíficas, pueden ser debidas a las diferentes condiciones en las que se realizaron los experimentos. En el caso de los organismos de la misma especie, el incremento en la concentración de amonio pudo ser originado por la diferencia en las salinidades del medio externo. Al respecto, se señala que el incremento de la salinidad disminuye la excreción nitrogenada de los organismos y por lo tanto origina un incremento del amonio en la hemolinfa (Armstrong *et al.*, 1981 citados en Regnault, 1987).

El incremento de la concentración del amonio en el medio interno de los camarones expuestos en un corto período (24 h) y en exposiciones crónicas (21d) a 0.7 mg N-NH<sub>3</sub> l<sup>-1</sup>, concuerda con los resultados obtenidos en los juveniles de *P. paulensis* donde en concentraciones de 50 mg N-NH<sub>3</sub> l<sup>-1</sup> se observa un incremento significativo de este compuesto en la hemolinfa (Schmitt y Santos, 1999). De igual forma, en los juveniles de *L. setiferus* mantenidos en 17 ‰ el amonio acumulado se incrementa de manera significativa al exponerse 24 h a 0.4 y 0.7 mg N-NH<sub>3</sub> l<sup>-1</sup> (Ríos, 2001). El incremento del amonio en el medio interno de los juveniles indican que aún en exposiciones a corto plazo concentraciones subletales de amonio pueden ocasionar una alteración en el estado fisiológico de los organismos.

El efecto adverso de la exposición al amonio en la regulación iónica y osmótica en camarones peneidos se ha relacionado con la acumulación de amonio en su medio interno. Tales alteraciones se han documentado en camarones expuestos en concentraciones elevadas de amonio externo (Chen *et al.*, 1994, Chen y Chen, 1996 Rebelo *et al.*, 1999). Chen y Chen (1996) reportan una disminución del 38% en la concentración de Na<sup>+</sup> y del 9% en la concentración de Cl<sup>-</sup> en los juveniles de *P. japonicus* expuestos a 1.1 mg N-NH<sub>3</sub> l<sup>-1</sup> durante 24 h, con una consecuente disminución en la

presión osmótica. En contraste, Young-Lai *et al.* (1991) reportan que la presión osmótica de *Homarus americanus* disminuyó al exponer los organismos durante 96 h a 3.18 mg N-NH<sub>3</sub> l<sup>-1</sup> (200 mg N-AT l<sup>-1</sup>); sin embargo, la concentración de Na<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup> no se modificó significativamente. Los resultados obtenidos en el presente estudio denotan que niveles subletales mucho menores a los empleados por los autores anteriores pueden alterar el balance iónico y osmótico de los camarones.

En la presión osmótica del medio interno de los organismos participan principalmente los iones Na<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup>. Al respecto Castille y Lawrence (1981) reportan que en los juveniles de *L. setiferus* la participación de estos iones es del 76 al 94 %. Este intervalo es similar al obtenido (70-80 %) en este estudio en los camarones del grupo testigo y coincide con lo reportado en juveniles de la especie por Ríos (2001).

El incremento de la presión osmótica del medio interno de los organismos expuestos a 0.4 mg N-NH<sub>3</sub> l<sup>-1</sup> durante 24 h es debido principalmente al incremento en las concentraciones del Na<sup>+</sup> y del Cl<sup>-</sup> y en menor grado al aumento de los niveles de K<sup>+</sup>. El incremento del K<sup>+</sup> puede relacionarse a su vez con el incremento en la permeabilidad de la membrana (Lin *et al.*, 1993) y con la activación del intercambio iónico Na<sup>+</sup>/NH<sub>4</sub><sup>+</sup> mediante la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATP asa como un mecanismo de desintoxicación del amonio donde el NH<sub>4</sub><sup>+</sup> sustituye al K<sup>+</sup> el cual se incrementa en el medio interno (Spaargaren, 1990).

A pesar de que en algunas células el potencial eléctrico y el gradiente electroquímico del Cl<sup>-</sup> es bajo y que por lo tanto contribuye en menor grado en el potencial de reposo de las membranas, el incremento del Cl<sup>-</sup> en la hemolinfa de los juveniles de *L. setiferus* expuestos 1 d a 0.4 mg N-NH<sub>3</sub> l<sup>-1</sup> pudo originarse para contrarrestar la polarización de la membrana a causa del incremento de la concentración de Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup> en la hemolinfa de estos organismos y mantener el equilibrio en el potencial electroquímico, como ha sido sugerido por Spaargaren (1990), Randall *et al.* (1997) y Wilkie (1997).

La disminución del Na<sup>+</sup> y del Cl<sup>-</sup> en la hemolinfa de los organismos expuestos 21 d a 0.2 y 0.4 mg N-NH<sub>3</sub> l<sup>-1</sup>, es semejante a lo obtenido por Lin *et al.*, (1993) quienes reportan una disminución de la  $\Delta Na^+$  y  $\Delta Cl^-$  a medida de que se incrementó la concentración externa de amonio en *Penaeus japonicus* expuestos 48 h a 1.3 y 2.8 mg N-NH<sub>3</sub> l<sup>-1</sup>. Los autores proponen que el amonio puede incrementar la permeabilidad branquial y con esto la pérdida de los iones al exterior. Sin embargo, los juveniles de *L. setiferus* son hipo-osmóticos e hipo-iónicos (para el caso del Na<sup>+</sup> y del Cl<sup>-</sup>) al medio externo por lo que es probable suponer que la pérdida de Na<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup> pudiera relacionarse con la sustitución del K<sup>+</sup> por el NH<sub>4</sub><sup>+</sup> en el intercambio Na<sup>+</sup>/NH<sub>4</sub><sup>+</sup> y en el cotransporte Na<sup>+</sup>/2Cl<sup>-</sup>/NH<sub>4</sub><sup>+</sup> como una medida de desintoxicación del amonio acumulado en la hemolinfa, si bien no en las tasas

y en la magnitud requerida para reducir su concentración en el medio interno. La eliminación del amonio por el mecanismo de cotransporte mencionado ha sido documentada por Wilkie (1997). Sin embargo, estos procesos no explican la reducción del  $K^+$  observado en los camarones.

Por otra parte, ausencia de efecto del amonio sobre la presión osmótica aunada a la disminución de los iones a los 21 d de exposición a 0.2 y 0.4 mg  $N-NH_3 \text{ l}^{-1}$ , los cuales contribuyeron en igual proporción en la presión osmótica en las diferentes concentraciones de amonio y en los diferentes tiempos de exposición, podría ser explicada por la contribución de algún compuesto osmoefector. Al respecto Chen y Chen (2000) establecen que los niveles de amoniácidos libres total de la hemolinfa de *P. monodon* incrementan al incrementarse la concentración externa de amonio, originado por el catabolismo de la hemocianina y de las proteínas de medio interno ante el efecto del amonio en la osmoregulación de los organismos.

Al igual que en algunos teleósteos, se ha sugerido que los crustáceos peneidos presentan la capacidad de cambiar su patrón de excreción de amoniotélicos a ureotélicos al exponerse en elevadas concentraciones ambientales de amonio como un mecanismo de desintoxicación del amonio acumulado en el medio interno. Este comportamiento se ha observado en *P. japonicus* y *P. monodon* expuestos durante 24h a 0.35 y 0.07 mg  $N-NH_3 \text{ l}^{-1}$  (Chen y Chen, 1993a y 1993b). Sin embargo, no se conoce con exactitud cual es la ruta metabólica por la cual se sintetiza la urea en estos organismos (Chen y Cheng, 1993b; Chen y Chen, 1997). Hochachka y Somero (1978) proponen que la urea puede ser sintetizada por la acción de la arginasa, mientras que Claybrook (1983) sugiere dos rutas: la hidrólisis de la arginina y la ruta uricolítica.

De acuerdo a los resultados obtenidos en *L. setiferus*, no se observa de manera clara si estos organismos tienen la capacidad de sintetizar, acumular y excretar urea como un mecanismo de desintoxicación al amonio ambiental, debido a que el incremento de la actividad de la enzima arginasa no se relaciona con los incrementos en la concentración de urea.

La concentración de la urea en la hemolinfa de los juveniles del grupo testigo es semejante a lo obtenido en los juveniles de *P. paulensis* (37.4 mg N-urea  $\text{l}^{-1}$ ; Schmitt y Santos, 1999) pero mayor a la reportada en *P. japonicus* (11.7 mg N-urea  $\text{l}^{-1}$ ; Chen y Chen, 1996). Al exponer los camarones durante 24 h al amonio no se observó un incremento en los niveles internos de urea (hemolinfa, branquia y hepatopáncreas) a excepción de los organismos expuestos a 0.7 mg  $N-NH_3 \text{ l}^{-1}$  donde el incremento de los niveles de urea en branquia se relacionan con la mayor acumulación de amonio en branquia. Sin embargo, la actividad de la arginasa en este tejido no se modifica, lo cual sugiere

que la síntesis de urea ocurre por una ruta alternativa a hidrólisis de la arginina. La disminución de la urea en la hemolinfa de los juveniles de *L. setiferus* expuestos 21 d a 0.2 mg N-NH<sub>3</sub> l<sup>-1</sup> pudiera estar relacionada con la eliminación de este compuesto, si bien esto no se ve reflejado en los resultados obtenidos en la excreción de urea de los camarones. Knoph y Thorud (1996) señalan que en el salmón *Salmo salar* al exponerse 14-15 d a 0.003-0.112 mg N-NH<sub>3</sub> l<sup>-1</sup> la concentración de urea en el plasma disminuye debido posiblemente al incremento de la excreción de urea.

De manera general los valores de la concentración de la urea en la hemolinfa, las branquias y en el hepatopáncreas de los organismos indica que el amonio externo no está teniendo un efecto en la síntesis y acumulación de este compuesto. Así mismo, sugieren que en las condiciones evaluadas, la urea no está desempeñando un papel en la desintoxicación al amonio en los juveniles de *L. setiferus*. Este comportamiento concuerda con los resultados obtenidos en *P. paulensis* expuestos en amonio durante el mismo período (Schmitt y Santos, 1999).

Aunado a lo anterior, la actividad de la arginasa en los tres tejidos de *L. setiferus* evaluados en el presente estudio no muestra de manera clara si la formación de urea esta actuando como mecanismo de desintoxicación, debido a que a pesar de observarse un incremento en la actividad de la arginasa en las branquias y en el hepatopáncreas de los organismos expuestos 1 y 21 d a 0.2 y a 0.7 mg N-NH<sub>3</sub> l<sup>-1</sup>, no se obtuvo acumulación de urea en la hemolinfa de los juveniles. En contraste, Chen y Chen (1997) sugieren como mecanismos de desintoxicación del amonio la hidrólisis de la arginina al incrementarse la actividad de esta enzima en la branquia, en el intestino y en el hepatopáncreas de los juveniles de *P. japonicus* al exponerse durante 24 h a 0.07 y 0.7 mg N-NH<sub>3</sub> l<sup>-1</sup>, además del incremento de la excreción de urea.

Respecto a la actividad de la arginasa en estos diferentes tejidos Hanlon (1975) indica que en el hepatopáncreas de los decápodos *Carcinus maenas*, *Cancer irroratus*, *C. borealis*, *Libinia emarginata* y en *Eupagurus pollicarus* la actividad de la arginasa oscila de 1.1-658.0  $\mu$ moles ornitina g<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, mientras que el músculo es un tejido que generalmente presenta una pobre actividad de esta enzima. Al respecto Hartenstein (1971; citado en Craybrook, 1983) señala que el tejido muscular presenta apenas una cuarta parte de la actividad de la arginasa que se obtiene en el hepatopáncreas.

Los anteriores comportamientos indican que la actividad de la arginasa no está jugando un papel en la desintoxicación del amonio en los juveniles de *L. setiferus*. Lo anterior coincide con los resultados obtenidos en los juveniles de *P. paulensis*, donde se sugiere que la urea no está involucrada en los procesos de desintoxicación del amonio cuando los camarones se exponen en concentraciones

subletales de este tóxico, en su caso se propone la ruta uricolítica como la probable ruta de síntesis de urea y por lo tanto de desintoxicación del amonio (Schmitt y Santos, 1999).

Bender (1975) y Katunuma *et al.* (1975; citado en King *et al.*, 1985) señalan que la glutamina sintetasa interviene en la desintoxicación del amonio, en el almacenamiento del nitrógeno y de su transporte. King *et al.*, (1985) a su vez sugieren que la glutamina sintetizada en el músculo juega un papel importante en cangrejos marinos en la desintoxicación del amonio y en su transporte a través de la hemlinfa a la branquia, donde es eliminado por la hidrólisis de la glutamina. En contraste, en los juveniles de *P. monodon* la glutamina no participa en la desintoxicación del amonio; se sugiere que el mecanismo responsable es la hidrólisis de la arginina, a partir del incremento de la ornitina y de la urea en el hepatopáncreas y de la disminución de la arginina (Chen y Chen, 2000).

A pesar de que se han realizado algunos trabajos en donde se avalúa el efecto del amonio en el crecimiento de camarones (Chen y Kou, 1992; Noor Hamid *et al.*, 1994; Robles, 1997 y Molina, 1998), el presente trabajo aborda un aspecto poco estudiado en los camarones peneidos que es la evaluación en exposiciones crónicas de respuestas fisiológicas como el metabolismo energético, el metabolismo nitrogenado, el balance hidrosalino y los mecanismos de desintoxicación del amonio. Este último ha permitido a su vez profundizar de manera indirecta un poco más sobre el metabolismo nitrogenado de los juveniles de *L. setiferus*. Sin embargo, aún es necesario realizar estudios que permitan determinar si el mecanismo de desintoxicación del amonio en los juveniles de *L. setiferus* ocurre a través de la ruta uricolítica o por algunos de los otros mecanismos reportados para invertebrados.

---

**CONCLUSIONES**

- Los juveniles de *Litopenaeus setiferus* son sensibles al efecto tóxico del amonio aún en concentraciones bajas ( $0.2 \text{ mg N-NH}_3 \text{ l}^{-1}$ ) y en cortos períodos de exposición (1d). No obstante, la concentración de amonio que compromete en mayor grado el estado fisiológico de los juveniles de *L. setiferus* es  $0.7 \text{ mg N-NH}_3 \text{ l}^{-1}$ , concentración en la cual se registró una mortalidad del 30 % en exposiciones crónicas de 21 d.
- En exposiciones cortas (24 h) al amonio, el consumo de oxígeno de *L. setiferus* refleja las alteraciones de los organismos por la acción tóxica del compuesto aún desde concentraciones bajas como  $0.2 \text{ mg N-NH}_3 \text{ l}^{-1}$ . Sin embargo, en exposiciones crónicas al amonio (21d) la tasa metabólica no se relaciona con las alteraciones del estado fisiológico de los organismos por el efecto tóxico del amonio.
- Los cambios en el ritmo circádico de los juveniles, de un comportamiento bimodal a unimodal, pueden ser reflejo de un efecto neurotóxico del amonio.
- La exposición al amonio, en períodos cortos y prolongados, modifica la amplitud metabólica de los camarones. El incremento de la amplitud metabólica sugiere un incremento en la demanda energética para contrarrestar la acción tóxica del amonio.
- La excreción nitrogenada no se modifica en los juveniles expuestos 24 h a las diferentes concentraciones de amonio. En contraste, a los 21 d de exposición los valores negativos de la excreción nitrogenada sugiere la incorporación del amonio hacia el medio interno de los organismos.
- En períodos cortos de exposición (1 d), la acumulación del amonio en la hemolinfa de los juveniles de *L. setiferus* ocurre en la mayor concentración de amonio externo ( $0.7 \text{ mg N-NH}_3 \text{ l}^{-1}$ ); en exposiciones crónicas (21d) la acumulación se presenta desde la menor concentración ( $0.2 \text{ mg N-NH}_3 \text{ l}^{-1}$ ).
- El amonio no modifica la presión osmótica de los camarones expuestos durante 1d, salvo en los expuestos en  $0.4 \text{ mg N-NH}_3 \text{ l}^{-1}$ ; en contraste, a los 21 d de exposición ésta permanece sin cambios. En su caso, la alteración en la presión osmótica se relaciona con los cambios en la



concentración de los iones del medio interno de los organismos. Sin embargo, la contribución de los iones a la presión osmótica de la hemolinfa permanece constante.

- El incremento de la concentración del amonio en la branquia y en el hepatopáncreas de los organismos indica que son órganos en donde ocurre la acumulación del amonio, a diferencia del músculo en donde la concentración del amonio no se modifica por la exposición al contaminante.
- De acuerdo a los resultados obtenidos, no se observa claramente la capacidad de los juveniles de *L. setiferus* de sintetizar, acumular y excretar urea como un mecanismo de desintoxicación al amonio ambiental. Así mismo, la actividad enzimática de la arginasa evaluada en branquia y hepatopáncreas, no muestra de manera clara su relación con la síntesis de urea.

## LITERATURA CITADA

- Alcaraz, G., X. Chiappa and C. Vanegas. 1997. Temperature tolerance of *Penaeus setiferus* postlarvae exposed to ammonia and nitrite. *Aquat. Toxicol.* 39: 345-353.
- Alcaraz, G. V. Espinoza, C. Vanegas and X. Chiappa. 1999. Acute effect of ammonia and nitrite to white shrimp *Penaeus setiferus* postlarvae under different oxygen consumption. *J. World Aquac. Soc.* 30 (1):98-106.
- Alejandre, G. S. 2001. Actividad y metabolismo energético en juveniles de *Litopenaeus setiferus* (Crustacea: Decapoda) expuestos al amonio. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias. UNAM. (en proceso).
- Bender D. A. 1975. *Amino Acid Metabolism*. John Wiley, N. Y. 89 p.
- Bower C. E. and J. P. Bidwell. 1978. Ionization of ammonia in seawater. Effects of temperature, pH and salinity. *J. Fish. Res. Board Ca.* 35:1012-1016.
- Campbell, J. W. 1991. Excretory Nitrogen Metabolism. p. 277-324. In. Prosser C. L. (Ed.). *Environmental and Metabolic Animal Physiology*. Wiley-Liss. USA.
- Castille and 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.* 68A: 75-80.
- Cech J.J. 1990. Respirometry. p. 335-362. In. Schreck C. B. y 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 hemolymph of *Penaeus japonicus* exposed to ambient ammonia. *Comp. Biochem. Physiol.* 114(1):35-38.
- Chen J. C. and Chen J. M. 1997. Arginase specific activity and nitrogenous excretion of *Penaeus japonicus* exposed to elevated ambient ammonia. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 153: 197-202.
- Chen J. M. y J. Chen. 2000. Study on the free amino acid levels in the hemolymph, gill, hepatopancreas and muscle of *Penaeus monodon* exposed to elevated ambient ammonia. *Aquatic Toxicology.* 50: 27-37.
- Chen J. C. and S. Y. Cheng 1993a. Hemolymph osmolality, acid-base balance and shift of ammonotelic to ureotelic excretory pattern of *Penaeus japonicus* exposed to ambient ammonia. *Comp. Biochem Physiol.* 106(3):733-737.
- Chen J. C. and S. Y. Cheng. 1993b. Hemolymph PCO<sub>2</sub>, hemocyanin, protein levels and urea excretions of *Penaeus monodon* exposed to ambient ammonia. *Aquat. Toxicol.* 27:281-292.
- Chen J. C. and Y. Z. Kou. 1991. Accumulation of ammonia in the hemolymph of *Penaeus japonicus* exposed to ambient ammonia. *Dis. Aquat. Org.* 11:187-191.

- Chen, J. C. and Y. Z. Kou. 1992. Effects of ammonia on growth and molting of *Penaeus japonicus* juveniles. *Aquaculture*. 104: 249-260.
- Chen J. C. and S. Lai. 1992. Oxygen consumption and ammonia-N excretion of *Penaeus japonicus* adolescents exposed to ambient ammonia. *Comp. Biochem Physiol.* 102C (2):129-133.
- Chen J. C. and C. Y. Lin. 1992. Oxygen consumption and ammonia-N excretion of *Penaeus chinensis* juveniles exposed to ambient ammonia at different salinity levels. *Comp. Biochem. Physiol.* 102C(2): 287-291.
- Chen, J. C., P. C. Liu and Y. T. Lin. 1988. Super intensive culture of red-tailed shrimp *Penaeus penicillatus*. *J. World Aqua. Soc.* 19(3):127-131.
- Chen J. C. and F. H. Nan. 1992. Effect of ambient to 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. Kou. 1991. Oxygen consumption and ammonia-N excretion of prawns (*Penaeus chinensis*) exposed to ambient to ammonia. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 21:377-382.
- Chen J. C., C. T. Chen and S. Y. Cheng. 1994. 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.
- Claybrook, D. L. 1983. Nitrogen Metabolism 163-213 pp. *The Biology of Crustacea* In: Bliss D. E. (Ed.) Academic Press, London. 471 p.
- Collins M. T., J. B. Gratzek, E. B. Shotts Jr. D. L. Dawe, L. M. Campbell and D. R. Senn. 1975. Nitrification in an aquatic recirculating system. *J. Fish Res. Board Can.* 32: 2025-2031.
- Franco, N. M.A. 1998. Diseño y evaluación de un sistema experimental para el tratamiento biológico del efluente de una granja camaronícola semi-intensivo. Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias. CIAD, A. C. Mazatlán México. 121 p.
- Fromm P. O. and J. R. Gillette. 1968. Effect of ambient ammonia on blood ammonia and nitrogen excretion of rainbow Trout. *Comp. Biochem. Physiol.* 26: 887-896.
- Gaxiola, G. 1994. Requerimientos nutricionales de postlarvas y juveniles de *Penaeus setiferus* y *Penaeus duorarum* (Crustacea: Decapoda). Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias. UNAM. 110 p.
- Hanlon D. P. 1975. The distribution of arginase and urease in marine invertebrate. *Comp. Biochem. Physiol.* 52B: 261-264.
- Hargreaves, J. A. 1998. Nitrogen biogeochemistry of aquaculture ponds. *Aquaculture*. 166:181-212
- Hastings W. H., B. Rusak and Z. Boulos. 1991 *Circadian Rhythms: The Physiology of Biological Timing*. 435-546 p. In: *Neural and Integrative Animal Physiology* Prosser L. (Ed.) Wiley-Liss Inc. N.Y.

- Hochachka, P. W. and G. N. Somero. 1978. *Strategies of Biochemical Adaptation*. Saunders C. London. 358 p.
- Jensen, F. B.; M. Nikinmaa y R. E. Weber. 1993. *Environmental perturbations of oxygen transport in teleost fishes: causes consequences and compensations*. pp. 161-179. In: Fish Ecophysiology. Rankin M. and F, B, Jensen (Eds.) Chapman and Hall. London.
- Jobling M. 1994. *Fish Bioenergetics*. Chapman & Hall. Londres. G. B. 309 p.
- King F., T. Cucci and 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 the seawater blue crab (*Callinectes sapidus*) occurs by diffusion, and not  $\text{Na}^+/\text{NH}_4^+$  exchange. *J. Comp. Physiol.* 141: 457-462.
- Knoph M. B. and K. Thorud. 1996. Toxicity of ammonia to Atlantic salmon (*Salmo salar*) in seawater- Effects on plasma osmolality, ion, ammonia, urea and glucosa levels and hematologic parameters. *Comp. Biochem. Physiol.* 113A(4): 375-381.
- Lin H. P., P. Thuet, J. P. Trilles, R. Mouret-Guillaume, G. Charmantier. 1993. Effects of ammonia on survival and osmorregulation of various development stages on the shrimp *Penaeus japonicus*. *Mar. Bio.* 117:591-598.
- Lehninger A; D. Nelson and M. Cox. 1993. *Principles of Biochemistry*. Worth Publishers, Inc. N. Y. 1013 p.
- Mathews Ch. and V. Holde. 1998. Bioquímica. Mc Grow-Hill Interamericana. Madrid. 1283p
- Molina, H, G. Alcaraz, X. Chiappa y C. Vanegas. 1997. Efecto del ayuno en el metabolismo de postlarvas de *Penaeus setiferus*. XIV Congreso Nacional de Zoología, Guanajuato, Gto.
- Molina A. H. 1998. Alteraciones fisiológicas en postlarvas de *Penaeus vannamei* (Crustacea: Decapoda) por efecto del amonio. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias. UNAM. 55 p
- Noor-Hamid, S. R. D. Fortes and F. Parado-Estepa. 1994. Effect of pH and ammonia on survival and growth of the early larval stages of *Penaeus monodon Fabricius Aquaculture*. 125:67-72.
- Pérez-Farfante, I. and B. Kensley. 1997. *Penaeoid and Sergestoid Shrimps and Prawns of the World*. Editions du muséum national d'Historie. Paris. 233 p.
- Randall D., W. Burggren and K. French 1997. *Animal Physiology Mechanisms and adaptations*. W. H. Freeman and Company. N. Y. 727 p.
- Rebelo, M. F., E. A. Santos and J. M. Monserrat. 1999. Ammonia exposure of *Chasmagnathus granulata* (Crustacea, Decapoda) Dana, 1951: accumulation in haemolymph and effects on osmorregulation. *Comp. Biochem Physiol.* 122A. 429-435.
- Regnault, M. 1987. Nitrogen excretion in marine and fresh-water crustacea. *Biol Rev* 62: 1-24.
- Regnault, M. 1992. Effect of air exposure on nitrogen metabolism in the crab *Cancer pagurus*. *J. Exp. Zool.* 264: 372-380.

- Ríos T. E. 2001 Efecto del amonio en la osmoregulación de juveniles de *Litopenaeus setiferus*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM. 68 p.
- Robles, C. 1997. Alteraciones fisiológicas de postlarvas y juveniles del camarón blanco *Penaeus setiferus* (Crustacea: Decapoda) por efecto del amoniaco. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias UNAM. 38p.
- Rodier, J. 1981. *Analisis de las aguas*. Omega. Barcelona. 504 p.
- Rosas, C. E. Martínez, G. Gaxiola, R. Brito, A. Sánchez and L. A. Soto. 1999. The effect of dissolved oxygen and salinity on oxygen consumption, ammonia excretion and osmotic pressure of *Penaeus setiferus* (Linnaeus) juveniles. *J. Exp. Mar. Biol. and Ecol.* 234:41-57.
- Russo, R.C. 1985. *Ammonia, Nitrite and Nitrate*. p. 455-476. *In: Fundamentals of Aquatic Toxicology: Methods and Applications*. Rand G. M. and Petrocelli S. R. (Eds.) Hemisphere Publishing Corporation, USA.
- Schreck, C. B. 1990. *Physiological, Behavioral and Performance Indicators of Stress*. 29-37 p. *In: Biological Indicators of Stress in Fish*. Adams S. M. (Ed.). American Fisheries Symposium 8. Bethesda, Maryland.
- Schmitt A. S. C. and E. A. Santos, 1999. Haemolymph nitrogen constituents and nitrogen efflux rates of juvenile shrimp, *Penaeus paulensis* (Perez-Farfante), exposed to ambient ammonia-N. *Aquaculture Research*. 30: 1-11.
- Sandifer, P. A., J. S. Hopkins, A. D. Stokes and C. L. Browdy. 1993. Preliminary comparison of the native *P. setiferus* and Pacific *P. vannamei* white shrimp for pond culture in South Carolina, U S. A. *J. World Aquact. Soc.* 24 (3): 295-303.
- Sanders, N. K., Morris, J.J. Childress and B. R. Mc Mahon. 1992. Effects of ammonia trimethylamina, L. lactate and CO<sub>2</sub> on some decapod crustaceans haemocyanin. *Comp. Biochem. Physiol.* 101A(3):511-516.
- Skinner, D. M. 1985. *Integument, Pigments and Hormonal Processes*. 44-146 p. *In: Bliss, D. E. And L. H. Mantel* (Eds.). *The Biology of Crustacea*. Academic Press, Inc. N. Y.
- Smart, G. R. 1981. *Aspects of Water Quality Producing Stress in Intensive Fish Culture*. 277-293 p. *In: Stress and Fish*. Pickering A. D. (Ed.). Academic Press Inc. N. Y.
- Spaargaren, D. H. 1990. The effect of environmental ammonia concentrations on the ion-exchange of shore crabs, *Carcinus maenas* (L.). *Comp. Biochem. Physiol.* 97C: 87-91.
- Vanegas C. 1996. Efectos subletales del cadmio y zinc en *Penaeus setiferus*. Tesis Doctorado (Doctorado en Ciencias (Biología)). Facultad de Ciencias, UNAM. 118 p.
- Whitfield, M. 1974. The hidrolisis of amonium ions in sea water. A theoretical study. *J. Mar. Biol Ass U. K.* 54: 565-580.
- Wilkie. M. P 1997. Mechanism of ammonia excretion across fish gills. *Comp. Biochem. Physiol.* 118A: 39-50

- Wright, P. A. 1995. Nitrogen excretion: Three end products, many physiological roles. *J. Exp. Biol.* 198: 273-281.
- Young-Lai, 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. 1984. *Biostatistical analysis*. Prentice Hall. N. Y. 620 p.

# **A N E X O**

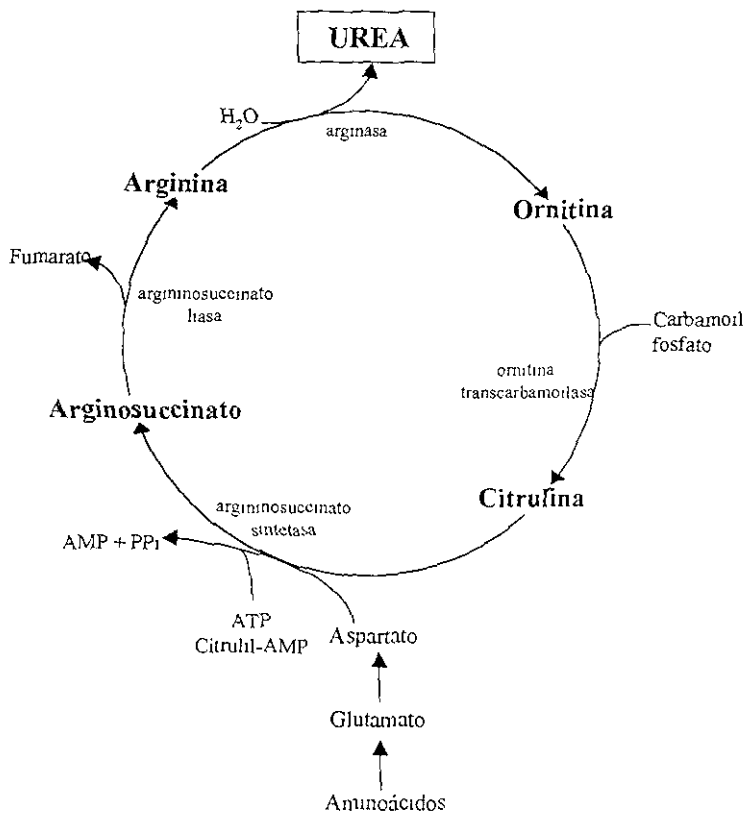


Figura A. Ciclo de la Urea. Tomada de Lehninger *et al.*, 1993.



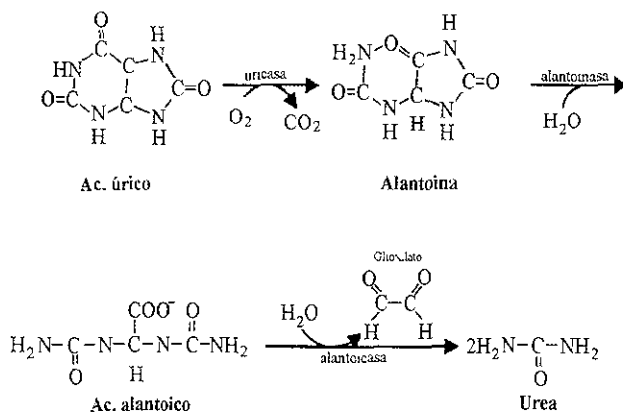


Figura B. Ruta Uricolítica. Tomada de Mathews *et al.*, 1998

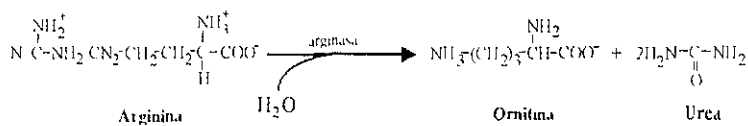


Figura C. Hidrólisis de la Arginina. Tomada de Mathews *et al.*, 1998

Tabla A. Análisis químico proximal del alimento empleado durante la exposición de juveniles de *Litopenaeus setiferus* en concentraciones subletales de amonio.

	Base Húmeda
Materia seca%	94.73
Humedad %	5.27
Proteína g kg <sup>-1</sup>	363.5
Lípidos g kg <sup>-1</sup>	100.4
Cenizas g kg <sup>-1</sup>	85.8
Fibra Cruda g kg <sup>-1</sup>	25.1
Carbohidratos g kg <sup>-1</sup>	372.6
T.N.D. %	82.37
E.D. Kcal kg <sup>-1</sup> (aprox.)	3631.63
E.M. Kcal kg <sup>-1</sup> (aprox.)	2977.62

INGREDIENTES. Proteínas animales de origen marino, harinas de origen animal, combinación de pastas oleaginosas, cereales molidos, subproductos alimenticios agrícolas e industriales, subproductos vegetales, subproductos de cereales, aceite de pescado, atrayentes naturales, Fosfolípidos, Vitamina A, Tiamina, Riboflavina, Piridoxina, Vitamina B-12, Niacina Cloruro de Colina, Vitamina D-3, Acido fólico, Vitamina K-3, Acido ascórbico estabilizado, Vitamina E, Biotina, Acido Pantoténico, Inositol, Cobalto (Sulfato), Fósforo, Cobre, Magnesio, Hierro, Zinc, Manganeso, Sodio, Antioxidante, Lisina, Metionina y Acido propiónico